

卵白タンパク質分子の加熱による
高次構造変化およびゲル形成機序に関する研究

2021 年

小山 翔大

目次

緒論.....	2
第1章 液卵白の加熱ゲル形成機序.....	7
第1節 加熱ゲル化における OVA およびその他タンパク質の寄与.....	7
1. 試料および方法.....	7
2. 結果.....	11
3. 考察.....	19
第2節 液卵白の加熱ゲル形成における共有結合.....	22
1. 試料および方法.....	22
2 結果.....	25
3 考察.....	33
要約.....	37
第2章 乾熱処理乾燥卵白の高硬度ゲル形成能.....	38
1. 試料および方法.....	38
2. 結果.....	42
3. 考察.....	61
第3章 総括.....	69
要旨.....	70
第1章 液卵白の加熱ゲル形成機序.....	70
第2章 乾燥卵白のゲル形成機序.....	72
総括.....	74
4章 要約.....	75
謝辞.....	77
参考文献.....	78

緒論

鶏卵は家庭での調理のほか、各種の加工品として全世界で広く利用されている (Yang and Baldwin, 1995)。鶏卵は卵殻、卵殻膜、カラザおよび可食部の卵黄および卵白からなる。卵黄の主成分は脂質およびタンパク質で、優れた乳化性を活かしてマヨネーズ製造等に重用されている。卵白は主に水分 (84~89%) およびタンパク質 (10~11%)、微量成分の脂質 (0.03%)、糖質 (0.9%) および無機物により構成される (Guha, Majumder, & Mine, 2018)。中でも卵白タンパク質は加熱ゲル化性、起泡性および乳化性に代表される優れた加工機能を示す。これら機能性を単体または組み合わせ、焼き菓子やパンの製造、畜肉加工品、水産練り製品および中華麺の物性改良などに幅広く利用されている (Mine, 1995)。

卵白タンパク質の大半は球状タンパク質で、オボアルブミン(OVA, 54%)、オボトランスフェリン(OVT, 12%)、オボムコイド(OVM, 11%)、オボグロブリン G2, G3(各 4%) リゾチーム(LYZ, 3.4%) により構成され、そのほかに繊維状のオボムチン(3.5%) が含まれる (Alleoni, 2006, Fig. 1)。OVA は 385 残基からなる分子量 44.5 kDa、等電点 4.5 の卵白の主要タンパク質で、ゲル形成の主体とされている。OVA はアスパラギン結合型糖鎖を有し、分子内に 4 個の遊離システイン残基および 1 個のジスルフィド(SS)結合を有するほか、リン酸化の程度が異なる分子種が存在する (Alleoni, 2006)。ネイティブな OVA (n-OVA, 変性温度 (T_d) =78.6°C) は鶏卵の貯蔵過程にて、熱変性温度の高い分子種である stable-OVA (S-OVA, T_d =83.4°C) およびこれらの中間体である Intermediate-OVA (I-OVA, T_d =87.0) に構造変化する現象(S 化)が生じることが報告されている (De Groot & De Jongh, 2003)。この OVA の S 化はゲル物性に影響するとされる (Shitamori, Kojima, & Nakamura, 1984)。

OVT は分子量 77.7 kDa で等電点 6.1 を示す糖タンパク質で、分子内に SS 結合を 15 個有する。OVT は熱安定性が低いタンパク質であるため、加熱凝集特性ならびに凝集抑制に着目した研究がなされてきた (Matsudomi *et al.*, 1991; Mizutani *et al.*, 2006; Nakamura, Umemura, & Takemoto, 1979)。

OVM は 20-25% の糖鎖を含有する糖タンパク質で、トリプシンインヒビター活性を持つタンパク質である (Alleoni, 2006)。なお、OVM は変性温度に達してもゲルネットワークには取り込まれず、ゲルマトリックスに存在するため、加熱ゲル形成には影響しないタンパク質である (Handa *et al.*, 1998)。オボムチンおよびオボグロブリン G2, G3 はメレンゲの調製など、起泡性の発現に深く寄与することが報告されている (Alleoni, 2006)。

LYZ は分子量 14.3 kDa、等電点 10.7 を示し、分子内に SS 結合を 4 個有す

るタンパク質で、細菌の細胞壁分解活性をもつ (Mine, 1995)。LYZ の等電点はアルカリ性側で、他の主要卵白タンパク質では酸性側であり、中性～弱アルカリ性 pH 域において正電荷を帯びたリゾチームは、負電荷を帯びた OVA をはじめとする他のタンパク質と静電気に相互作用するため、加熱凝集や起泡性への影響に関する研究が盛んになされてきた (Garibaldi *et al.*, 1965; Matsudomi *et al.*, 1991)。

各タンパク質の加熱凝集における相互作用については、その取り扱いの容易さや適用できる試験の幅広さから、主にゲルを形成しない希薄溶液を用いて研究がなされてきた。中性またはアルカリ性条件下において、負に帯電した OVA および OVT はそれぞれ正に帯電した LYZ と静電引力により強い親和性を示し、共存により凝集体の粒径が増大することが報告されている (Iwashita, Handa, & Shiraki, 2017, 2019; Matsudomi *et al.*, 1991)。一方、OVT は OVA の共存下において加熱凝集が抑制され、OVA の変性度が高いほどその効果は高まるとされている (Matsudomi, Oka, & Sonoda, 2002)。以上のように、加熱凝集に関する研究は、OVA、OVT、および LYZ を中心になされ、高濃度の卵白タンパク質溶液における加熱凝集により形成されるゲルの構造および物性発現においても、OVA、OVT、および LYZ は重要な役割を担うと考えられてきた。

Johnson & Zabbik (1981) は様々な方法で精製した卵白タンパク質を単体または混合して、一定タンパク濃度に調製した加熱ゲルの硬度を測定した結果より、LYZ 単体および混合試料は硬いゲルを形成する傾向にあることを示した。この試験では、様々な方法で調製したタンパク質を使用しているため、各タンパク質本来の性状に加えて、精製方法ごとに異なる変性が生じている可能性がある。また、この試験は、各タンパク質が同一の比率で混合されているが、卵白中のタンパクとは組成が異なる条件で行われている。以上のように、卵白加熱ゲルの構造および物性発現における、各タンパク質の寄与に関しては十分に解明されていない。

卵白の加熱ゲルは、卵白タンパク質の加熱変性により結合領域が露出し、結合領域同士の相互作用を介して形成された凝集体がさらに重合することにより形成される (Mine, 1995, Fig. 2)。卵白をはじめとする球状タンパク質の加熱ゲルは、球状を保ったまま細長く、数珠玉状につながった会合体が絡み合っただけで会合体を形成する数珠玉モデル、および塊状の凝集体を形成しこの凝集体同士が寄り集まって隙間の多い網目状構造を形成するランダム凝集体モデルの 2 種類に大別されると考えられている (Doi, 1993)。Doi らは、種々のイオン強度や pH にて調製した OVA の加熱ゲルについて、透明なゲルが形成される場合は数珠玉モデルが、不透明ゲルが形成される場合はランダム凝集体モデルが適用されることを見出した (Doi, 1993)。

また、この凝集および重合過程においては、疎水結合、水素結合、イオン結合などの非共有結合および、SS結合のような共有結合が関与することが、長らく定説とされてきた(Phillips, 1994)。中でも、SS結合はゲルの硬度形成に寄与すると報告されている。しかし、卵白ゲルを10 M 尿素および5% (v/v) 2-メルカプトエタノールにて処理し、疎水、水素およびSS結合を切断しても、可溶化しないとの報告もある (Beveridge *et al.*, 1980)。したがって、SS結合以外の共有結合が卵白ゲル形成に関与する可能性が推察されるが、十分な知見は得られていない。

食品産業において、チルドまたは冷凍状態で流通している液卵白または常温保存が可能な乾燥卵白がしばしば用いられている。乾燥卵白の中には、液卵白と同等のタンパク質濃度に調整した水溶液を加熱ゲルすると、液卵白にはない硬く弾力に富んだゲルを形成するものがある。同性質は、畜肉、すり身加工品および中華麺などのタンパク質性食品に硬さおよび弾力性を付与する物性制御に重用されている。

乾燥卵白は液卵白を脱糖および噴霧乾燥し、乾燥状態にて60~80°Cで3~30日加熱処理(乾熱処理)することにより製造される(Handa *et al.*, 2001)。この中でも、優れたゲル化性の発現には、乾熱処理が重要な役割を果たし、その処理時間が長いほどゲル硬度が向上するとされる(Kato *et al.*, 1989)。上記の背景から、乾熱処理が卵白タンパク質に与える影響ならびにゲル機序に関する研究が盛んに行われてきた。Katoら(1990a)は、乾熱処理した卵白タンパク質は希薄溶液にて加熱した際に凝集が抑制されることを明示し、その結果規則正しいネットワーク構造を持つ硬いゲルが形成されると提唱した。また、その際に乾熱処理により形成されるタンパク質可溶性凝集体がゲル構成単位になる可能性にも言及した。可溶性凝集体は乾熱処理の強度およびpHが異なる乾燥卵白製品を分析した結果より、その平均分子量とゲル強度の間に強い正の相関が認められている(Handa *et al.*, 2001)。卵白タンパク質およびOVAそれぞれの乾熱処理により、両者の表面負電荷が増加することも報告されている(Ma *et al.*, 2019; Mine, 1997)。したがって、タンパク質の静電反発力の増強が凝集を抑制し、ゲル形成に寄与する可能性も推察される。しかし、Ogawaら(2003)は凍結乾燥後乾熱処理した卵白およびOVAの水溶液よりゲルを調製する際、静電反発力を抑制するNaClを添加してもゲルの硬度に濃度依存的な傾向はみられないと報告しており、タンパク質表面負電荷のみでは高硬度ゲル形成要因の説明は困難である。Katoら(1990b)はさらに、示差走査熱量(DSC)分析の結果より、卵白タンパク質は乾熱処理によりゲル形成時にタンパク質の変性に要するエネルギーおよび変性温度が低下し、タンパク質分子のフレキシビリティが高くなることも明らかにし、同現象も高硬度ゲル化に寄

与する可能性があると言及している。しかし、タンパク質分子が変性しやすくフレキシビリティが高いほど、溶液中での加熱により疎水領域スルフィドリル (SH)基が露出しやすく、分子間相互作用しやすくなると考えられるため、両仮説についてはさらに検証し、妥当性を検討する必要がある。以上のように、乾熱処理による高硬度ゲル形成能獲得機序については有力な仮説は提唱されているものの、未だ結論が得られていない。さらに、凝集抑制や分子間相互作用の強化がなぜ生じるかなど、詳細な機構解明には至っていない。

以上の背景を踏まえて、本研究では、オボアルブミンおよびその他タンパク質のゲル形成への寄与、ゲル形成における共有結合の共有結合の寄与について解析すると共に、乾燥卵白ゲルが高硬度化する機序の解明に取り組んだ。

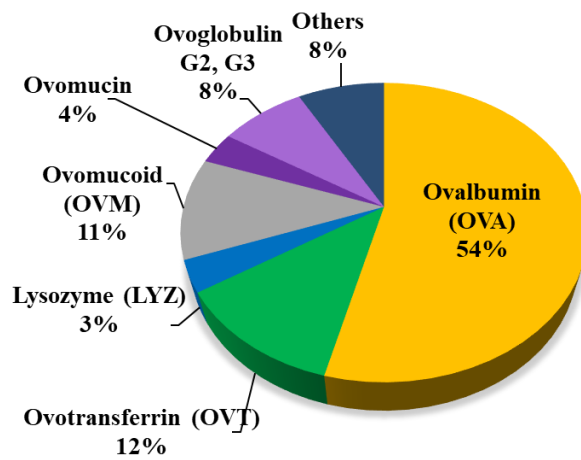


Fig. 1 Protein composition of egg white

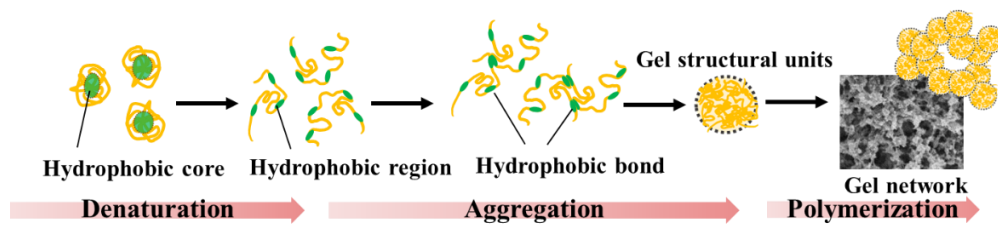


Fig. 2 Mechanisms for heat-induced gelling of egg white

第1章 液卵白の加熱ゲル形成機序

本章では、液卵白 (LW)の加熱ゲル形成に関して基礎的知見を得るために、その加熱ゲル物性の発現における OVA およびその他タンパク質の寄与、ならびにゲル形成に寄与する共有結合の探索を行った。

第1節 加熱ゲル化における OVA およびその他タンパク質の寄与

本節では、茹で卵や目玉焼きのような卵白の加熱ゲルに認められる「硬く、歯切れのよい」ゲル物性の発現における各卵白タンパク質の寄与について、主要タンパク質の OVA を軸に検討を行った。

1. 試料および方法

1.1 試薬

8-Anilino-1-naphthalenesulfonic Acid Magnesium (II) Salt (ANS)および 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)(DTNB)は東京化成工業株式会社(東京、日本)より購入した。25%グルタルアルデヒド(EM grade)は TAAB Laboratories Equipment Ltd. (Aldermaston, Berks, UK)より購入した。Polyethylene glycol (PEG) 8000 は Promega Co. (Madison, WI, USA)より購入した。その他の試薬は富士フイルム和光純薬株式会社(大阪、日本)より購入した。

1.2 OVA の精製

3通りの方法にて OVA の精製を行った。

陽イオン交換樹脂による精製は、Hirose & Kido (2002)の方法に従った。すなわち、Toyopearl CM-650M (東ソー株式会社、東京、日本)を 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 3.8)にて pH 3.8 に調整した卵白溶液と混和し、振盪 (25°C, 180 rpm, 20 min) 後、遠心分離 (20°C, 5,000×g, 10 min)にて得られた上澄を除去した。沈殿部の樹脂を 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 3.8)および 0.06 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5)の順に振盪および遠心分離にて段階的に洗浄し、0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 4.6)にて溶出した画分を遠心分離により回収した。回収した画分を Standard RC Tubing 3.5 kDa (Spectrum Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA)を用いて純水にて透析後、凍結乾燥した。

陰イオン交換樹脂による OVA の精製は、Croguennec ら (2000)の方法を一部改変して行った。Toyopearl SuperQ-650M (東ソー株式会社)と等量の 20 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 8.0)と混和した生卵白を混和し、樹脂にタンパク質を吸着後、オープンカラムに充填した。樹脂を 20 mM NaCl を含む Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0)にて洗浄後、100 mM NaCl を含む Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0)にて溶出し

た画分を Standard RC Tubing (3.5kD)を用いて純水にて透析後、凍結乾燥した。

Polyethylene glycol (PEG)8000 によるタンパク質沈殿法を利用した OVA 精製は、Geng ら (2019)らの方法を一部改変して行った。1 M HCl を用いて pH 7.0、5 % (w/w)に調製した液卵白に終濃度 15 % (w/v)となるよう PEG 8000 を溶解し、静置 (30 min)後、遠心分離 (25°C, 12,000×g, 15 min)した。得られた上澄を TOYOPEARL Super Q-650M に吸着し、樹脂を 30 mM NaCl を含む Tris-HCl 緩衝液(pH 8.0)にて洗浄後、500 mM NaCl を含む Tris-HCl 緩衝液(pH 8.0)にて溶出した画分を Standard RC Tubing(3.5kD)を用いて純水にて透析後、凍結乾燥した。各精製 OVA は Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)にてタンパク質量 76 mg/mL に調整し、加熱ゲル化および物性測定を行った。

1.3 試料調製

採卵後 3 日以内の市販の鶏卵を割卵後、卵白を分離し、ホモジナイザーにて均質化 (30 sec)した。均質化した卵白を遠心分離(10,000×g, 15 min, 25°C)し、上澄みを加熱処理 (64°C, 10 min)後、氷水にて急冷 (3 min)し、処理後の卵白を再度遠心分離 (10,000×g, 30 min, 25°C)して得た上澄み液を試料 (OVT-LYZ 除去卵白, OLdLW)とした。なお、加熱処理 (64°C, 10 min)を室温静置に置き換えた試料を対照 (生卵白, LW)とした。

各試料のタンパク質量を rapid MAX N exceed (Elementar Analysensysteme GmbH, Langenselbold, Germany)を用いてデュマ法にて測定した。pH メーター D-72 LAQUA (株式会社堀場製作所、京都、日本) にて pH を測定した。

1.4 ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

SDS-PAGE は Laemmli (1970)の方法を一部改変して行った。タンパク質溶液の半量の 8 M 尿素、60 % グリセロール、3 % SDS、50 mM DTT、および 0.01 % ブロモフェノールブルーを含有する 60.6 mM Tris-HCl (pH 6.8) と混和し、静置 (25°C, 24 h)しサンプル溶液を調製した。10-20 % e-pagel (アトー株式会社、東京、日本)にサンプル溶液および分子量マーカー XL-ladder broad (株式会社アンテグラル、徳島、日本) をアプライし、電気泳動を行った。

One step CBB (バイオクラフト株式会社、東京、日本)にてタンパク質バンドの染色を行った。電気泳動図の撮影およびバンド強度の算出は撮影装置 ChemiDoc および解析ソフト Quantitiy One (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)にて行った。

1.5 表面疎水性測定

表面疎水性の測定は Hayakawa & Nakai (1985) の方法を一部改変して行った。サンプルのタンパク質量を 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)にて、0.2%に調整し、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)に溶解した 2 mM ANS 溶液と混和し、直ちに RF-5000 (Shimadzu, Kyoto, Japan)にて励起波長 390 nm、で 470 nm における蛍光強度を測定した。

1.6 表面および総遊離 SH 基測定

SH 基の測定は Van Der Plancken ら (2005)の方法を改変し測定した。表面 SH 基は、タンパク質溶液を 202 μ M DTNB を含む Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0)と混和し、静置 (30 min, 25°C)後、遠心分離 (16,000 \times g, 10 min, 25°C)により不溶物を除去し、上澄の吸光度 (412 nm)測定を行った。総遊離 SH 基の測定はタンパク質溶液を 3 M 尿素、2 % SDS、101 μ M DTNB を含む Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0)と混和後、インキュベート (30 min, 40°C)し、その他の操作は表面 SH 基測定と同様に行った。還元型グルタチオンを標準試料として SH 基量を算出した。

1.7 DSC

サンプル 20 μ L をアルミニウムパンに密閉し、窒素ガス流量 0.1 L/min にて DSC 1 (Mettler-Toledo GmbH, Greifensee, Switzerland)を用いて、昇温条件 (30.0-93.0°C, 2.00°C/min)し、熱量分析を行った。得られたサーモグラムより、OVA の吸熱量を算出した。さらに、OVA の S 化に伴う分子構造の変化については、De Groot & De Jongh (2003)の報告に従い、N-OVA、I-OVA および S-OVA の変性温度をそれぞれ 78.6、83.4 および 87.0°C とし、各ピークの吸熱量比より存在比を求めた。

1.8 加熱ゲルの調製

1.1.1.2 にて調製した OVA は 0.1 M NaCl を用いて pH 7.0, タンパク質濃度 75 mg/mL に調製したものを使用した。LW および OLdLW は pH およびタンパク質濃度調整をせずに試験に用いた。2 mL 容のマイクロチューブに試料液 1.8 mL を分注し、ウォーターバスにて加熱 (90°C, 30 min)後、氷水にて 3 分間急冷し、2 時間室温静置した。ゲルをマイクロチューブより取り出し、テグスを用いて厚さ 7.0 mm の円柱状のゲル片を切り出した。

1.9 ゲルの色調測定

ゲル片を測色色差計 CM-5 (コニカミノルタ株式会社, 東京)の反射モード測定用プレート (Φ 3.0 mm)上に設置し、色差 ($L^*a^*b^*$)を測定した。

1.10 テクスチャープロファイル解析(TPA)

30 mm の円盤型ブランジャーを取り付けた Tensipresser MyBoy II system (タケトモ電機, 東京, 日本)により、ゲルをその厚さの 50 %まで 1.5 mm/second の速度で 2 回圧縮した。Bourne (1978)の Texture profile analysis に関する報告を参考に、Hardness, Cohesiveness, Resilience および Springiness を求めた。

1.11 離水率の測定

厚さ 7.0 mm にスライスしたゲル片をナイロンメンブレンで包み、ガラスビーズ (ϕ 3 mm) を約 2.0 g を敷いたマイクロチューブに設置し、遠心分離 (1,000 rpm, 10 min, 25°C)した。遠心分離前後のゲルの重量差から、ゲルの離水率を算出した。

1.12 ゲルの微細構造観察

ゲルをメスにて小さな直方体状に切断し、2 % グルタルアルデヒドに浸漬 (25°C, 24 h)し、ゲルの組織を固定した。固定したゲルを 50-100 %のエタノールにて段階的に脱水し、液体窒素中にて割断した。t-ブチルアルコールに浸漬した試料を、凍結乾燥器 ES-2030 (株式会社日立ハイテク, 東京, 日本)にて凍結乾燥し、試料台に接着した。試料にイオンスパッタ MC1000 (株式会社日立ハイテク)にて白金パラジウムを蒸着し、走査型電子顕微鏡 FE-SEM S-4800 (株式会社日立ハイテク)にてゲルの微細構造を観察した。

1.13 統計解析

データは平均値±標準偏差で示し、2 群間の有意差検定には Microsoft Excel 2016 を用いて、対応のない Student t-test を適用した ($p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**))。3 群以上の検定には Statcel 4 (OMS Publishing Inc., Tokyo, Japan)を使用し、Tukey-Kramer method ($p < 0.05$)にて行った。

2. 結果

2.1 精製 OVA の加熱ゲル化性

市販の OVA 精製品 (Albumin from chicken egg)、および陽イオン交換樹脂、陰イオン交換樹脂ならびに PEG 沈殿法により調製した OVA を用いて、加熱ゲルの物性を比較した (Fig. 3)。ゲルは市販 OVA のゲルにて最も硬く、次いで陽イオン交換樹脂精製 OVA、陰イオン交換樹脂精製 OVA の順に硬く、PEG 沈殿にて調製した OVA ゲルが最も軟らかかった。PEG 沈殿 OVA の硬度は市販 OVA の 61 %程度であった。また、復元性は陽イオン交換樹脂精製の OVA ゲルにて最も高く、陰イオン交換樹脂精製の OVA ゲルは最も低かった。硬さと復元性について一定の傾向は認められなかった。

2.2 液卵白におけるタンパク質の加熱凝集温度

各温度で加熱した液卵白を非還元 SDS-PAGE にて分析した結果、OVT は 64°C、LYZ は 62°C にて凝集が認められた (Fig. 4)。本試験で加熱した範囲において OVA の凝集は認められなかった。

2.3 OLdLW の pH およびタンパク質組成

LW およびその加熱および遠心分離により調製した OLdLW について性状を比較した。pH については、LW は 9.12 ± 0.07 、OLdLW は 9.13 ± 0.06 と試料間に差異は認められなかった。総タンパク質量は LW にて $10.5 \pm 0.2\%$ (w/w)、OLdLW にて $8.6 \pm 0.1\%$ (w/w) と減少が認められた。この処理によるタンパク質組成の変動を確認するために還元 SDS-PAGE を行った (Fig. 5)。その結果、LW では OVA、OVT、OVM および LYZ の明瞭なタンパク質バンドが確認された。一方、OLdLW において OVA および OVM のバンドのみが認められた。LW と比べて OLdLW では、OVT および LYZ に加え、250, 150, 50 kDa 付近の低強度のバンドの消失が認められた。OVA のバンド強度比は、LW にて 1.00 ± 0.04 、OLdLW にて 1.02 ± 0.05 と差異は認められなかった ($p < 0.05$)。したがって、OLdLW は LW と等量の OVA を含有し、そのほかに OVM も含むことが認められた。

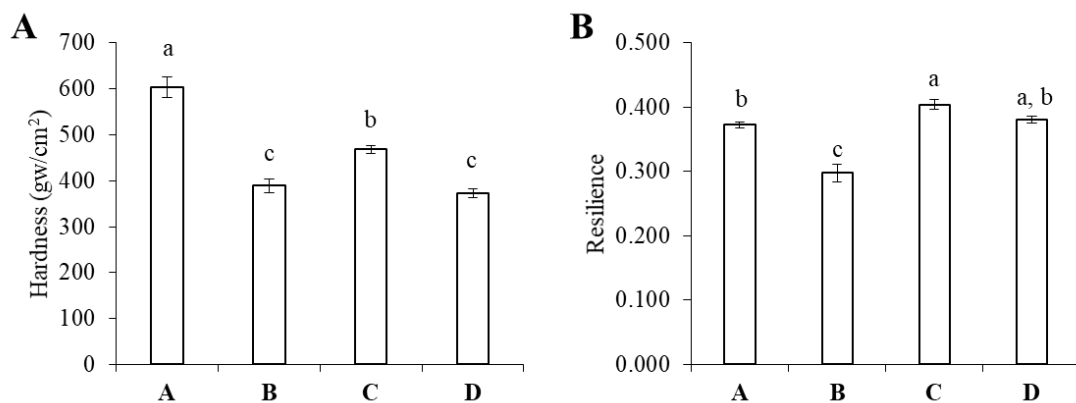


Fig. 3 Hardness (A) and resilience (B) for heat-induced gels of OVA. Albumin from chicken egg from Sigma-Aldrich Co. (A), and purified OVA prepared by anion exchange chromatography (B), cation exchange chromatography (C) and PEG precipitation (D) were used. Different letters indicate statistically significant differences at $p < 0.05$ ($n=6$).

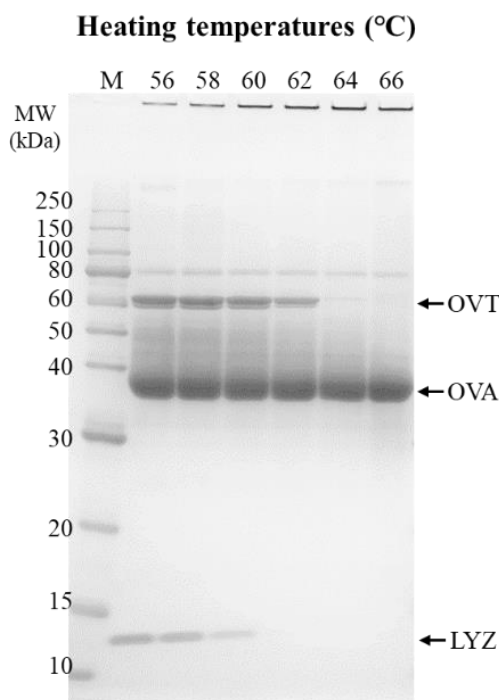


Fig. 4 The egg white proteins heated at each temperature for 10 min were analyzed by non-reducing SDS-PAGE. M, molecular weight marker; OVT, ovotransferrin; OVA, ovalbumin; LYZ, lysozyme.

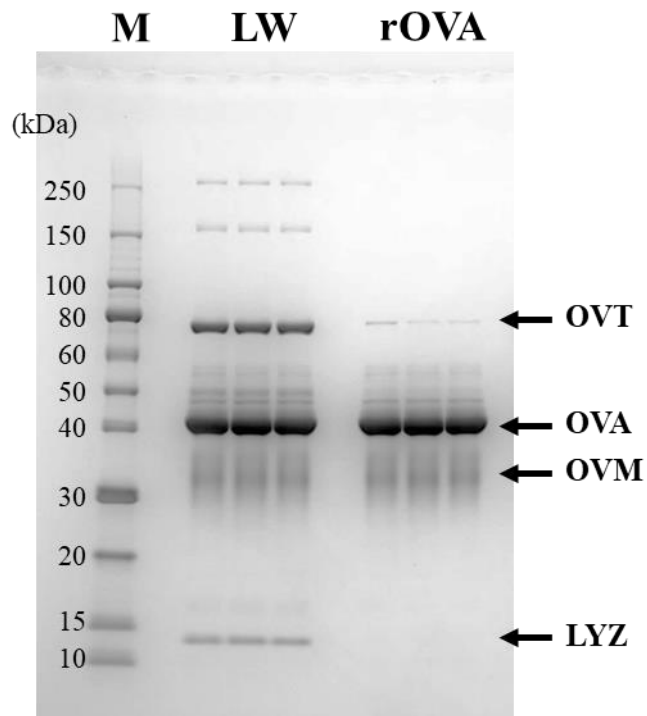


Fig. 5 Reducing SDS-PAGE patterns of REW and OLdLW. M, molecular weight marker; OVT, ovotransferrin; OVA, ovalbumin; OVG, ovoglobulin; OVM, ovomucoid; LYZ, lysozyme.

2.4 表面疎水性および SH 基量測定

表面疎水性は OLdLW では LW と比較して有意に増加したが、その差異は僅かであった(Table 1)。LW と比較して、OLdLW の表面 SH 基は有意に減少したが、総 SH 基の変動は認められなかった(Table 1)。

2.5 DSC 分析

DSC にて測定したサーモグラムについて、LW において 65.7°C に OVT および LYZ に相当するピーク、OVA に相当する 78.9°C および 83.9°C のピークの 2 成分が認められた(Fig. 6)。一方、OLdLW において OVA に相当するピークのみが認められた。OVA ピークの吸熱量は LW と OLdLW とで同等であった (Table 2)。

OVA について、各分子種の割合を確認したところ、両サンプルとも N-OVA および I-OVA に対応するピークが認められたが、S-OVA のピークは認められなかった (Fig. 6)。N-OVA に対する I-OVA の存在比は LW に比べて OLdLW にて有意に増加が認められたがその増加率は僅かであった(Table 2)。すなわち、OLdLW の調製時の加熱処理では OVA の S 化はほとんど生じないことが認められた。

Table 1 Comparison of surface hydrophobicity and SH group.

	LW	OLdLW
Surface hydrophobicity (F.I./mL)	29.1±0.6	35.3±0.8**
Surface SH (nmol/mL)	95.5±2.3	55.6±1.7**
Total SH (μmol/mL)	3.16±0.03	3.20±0.06

Data are shown as mean value ± standard deviation (SD) (n = 3).

** mean statistically significant difference at $p < 0.05$.

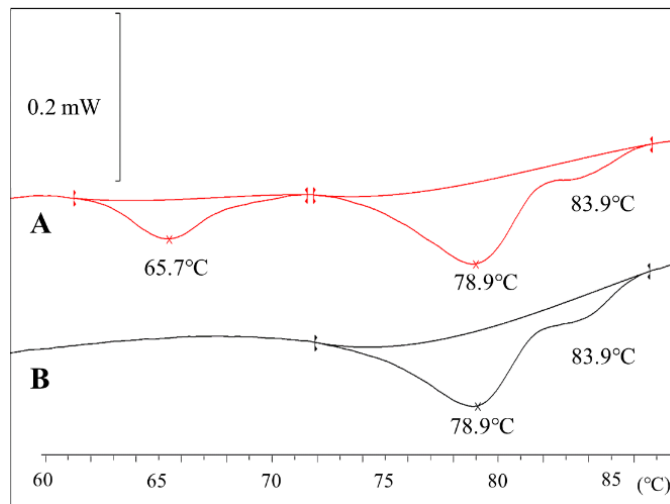


Fig. 6 DSC thermograms of LW (A) and OLdLW (B) proteins.

Table 2 Endothemic parameters of OVA measured by DSC

	LW	OLdLW
Peak area of OVA (J/mL)	0.60 ± 0.02	0.63±0.01
I-OVA rate (%)	10.3 ± 2.1	15.0 ± 0.3**

Data are shown as mean value ± SD (n = 3).

** mean statistically significant difference at $p < 0.05$.

2.6 ゲルのテクスチャプロフィール分析および離水率測定

LW および OLdLW の加熱ゲルについて物性測定を行った。OLdLW は単体で物性測定に堪えうるゲルを形成した (Fig. 7)。ゲルは LW よりも OLdLW で顕著に硬かった。一方、LW よりも OLdLW でゲルの凝集性、弾力性および復元性は有意に高かった。ゲルからの離水量には差異はなく、両試料より調製したゲルは同等の保水性を示した。以上より、OLdLW は LW よりも軟らかいが、弾力に富んだゲル形成能を有することが認められた。

2.7 加熱ゲルの色調および微細構造

ゲルの色差測定の結果、 L^* 値は LW よりも OLdLW にて顕著に減少したことから、ゲルの透明度は OLdLW の方が高いと認められた (Table 3)。また、 a^* には両試料にて差異は認められなかったが、 b^* は OLdLW にて有意に減少し、正から負に転じたことから、黄色みが弱まり青みが増加したと示された。

ゲル断面の微細構造を SEM にて観察した結果、両試料において球状の構成単位や繊維状構造が認められた。20,000 倍に拡大して観察した結果、LW のゲルは、連続した空隙の面積が小さく、一方で OLdLW のゲルは連続した空隙面積が大きい像が認められた (Fig. 8)。さらに、50,000 倍に拡大して観察した結果、LW では均質なサイズの球状の粒子が高密度且つ均質に認められたが、OLdLW では繊維状のネットワーク構造が多数認められた。

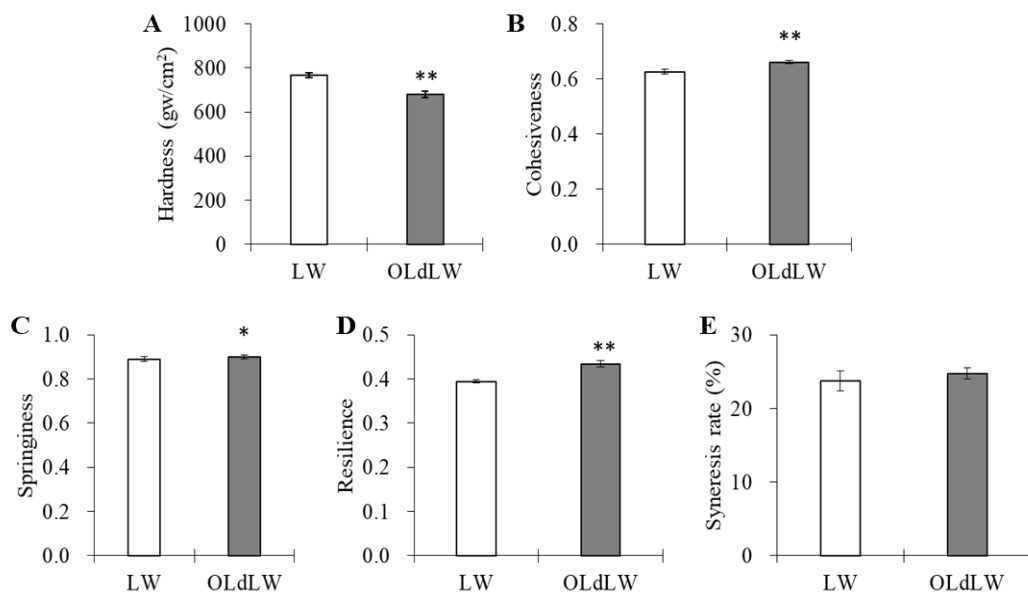


Fig. 7 Texture profile analysis and syneresis rate of the gels. Hardness (A), cohesiveness (B), springiness (C), resilience (D), syneresis rate (E). Data are shown as mean value \pm SD (n = 12). * and ** mean statistically significant difference at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

Table 3 Color differences of LW and OLdLW gels

	LW	OLdLW
L*	87.0 \pm 0.3	64.7 \pm 0.9**
a*	-4.3 \pm 0.1	-4.2 \pm 0.2
b*	2.6 \pm 0.2	-5.7 \pm 0.4**

Data are shown as mean value \pm SD (n = 6).

** represents significant difference from LW ($p < 0.05$)

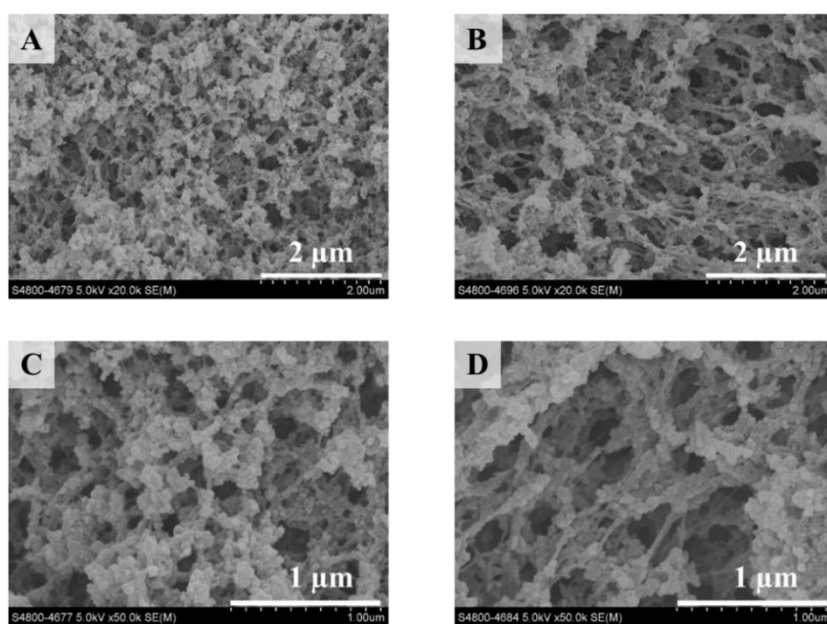


Fig. 8 Microstructure of gel networks prepared from LW (A, C) and OLdLW (B, D) observed by SEM at a magnification of 20,000 (A, B) and 50,000 (C, D).

3. 考察

3.1 OLdLW の組成および変性度の評価

本節では、LW の加熱ゲル物性の発現における OVA およびその他のタンパク質の役割解明を目的に研究を進めた。はじめに、OVA 単体でのゲル化性評価のために、文献に従って LW より OVA を精製し、市販の OVA とともにゲル物性を比較した結果、ゲルの硬さおよび復元性に大きなばらつきが認められ、一貫した傾向は認められなかった (Fig. 3)。したがって、タンパク質の種類は同じ OVA であっても、各精製過程において pH シフトおよび凍結乾燥などの影響で OVA の変性が生じること、または透析で除去しきれない塩類の残存がゲル物性に影響したと考えられた。なお、どの試料の調製にも試薬添加、透析、凍結乾燥が含まれることより、各試料ともある程度の変性が生じていると推察された。そこで、卵白のゲル物性発現要因を評価するためには、生卵白中の OVA と同等のネイティブな構造を極力維持したまま OVA を分離する必要があると考え、塩類を添加および凍結乾燥しない分離方法を検討した。

ゲル形成に寄与する主な卵白タンパク質には、OVA 以外に OVT および LYZ がある。単体で加熱する場合、加熱凝集温度に差異があるが、OVT および LYZ は約 65°C で共凝集すると報告されている (Iwashita *et al.*, 2019)。この報告をはじめとして、多くの報告は希薄溶液にて凝集温度を決定しているため、LW と同等の高濃度系における OVT および LYZ の凝集温度については改めて検討する必要がある。LW にて凝集温度を求めた結果、64°C、10 min の加熱により両者の凝集が認められた (Fig. 4)。これを利用し、液卵白を加熱 (64°C, 10 min) および遠心分離し、OVT および LYZ を凝集させ遠心分離にて除去することにより OLdLW を調製した。電気泳動の結果より、OLdLW のタンパク質は OVT、LYZ および微量に含まれるタンパク質が除去され、LW と等量の OVA および OVM を含むことが認められた (Fig. 5)。除去された微量のタンパク質は Mann の報告と照らし合わせると ovomucin, α -2-macroglobulin like protein, ovalbumin-related protein X、ovoinhibitor、であると推定された (Mann, 2007)。また、OLdLW には、OVA のみならず OVM の残存も認められたが、同タンパク質はゲルネットワークには取り込まれず、ゲル形成には寄与しないタンパク質であるとされる (Handa *et al.*, 1998)。以上を踏まえ、OLdLW は LW と等量の OVA を含有し、ゲル形成に関与する OVA 以外のタンパク質を除去できたものと判断した。

次に、OLdLW 中の OVA の変性度について検討した。両サンプルで総 SH 基の減少は認められず (Table 1)、OLdLW 調製により OVA の凝集は生じないことが示された。LW と比較して、OLdLW の表面疎水性はわずかに増加し、表面 SH 基量はむしろ減少が認められた (Table 1)。表面疎水性は球状タンパク

質の変性の指標であり(Hayakawa & Nakai, 1985)、表面 SH 基量は卵白の主要な球状タンパク質のうち OVA のみ遊離 SH 基を持つことから、その変性度の指標として利用される(Matsudomi, Takahashi, & Miyata, 2001)。本試験では、OLdLW の調製により OVA 量および総 SH 基量に変化は生じていないが、SH 基が減少したことから、OVA 以外のタンパク質にも SH 基を持つと考えられた。OLdLW の調製により除去されたオボムチンは遊離 SH 基を持つ(Omana, Wang, & Wu, 2010)と考えられるため、表面 SH 基が減少した原因であると推察された。また、1% (w/w)の卵白希薄溶液(pH 8.8)を 20 分間加熱しても、70°C 以下では表面 SH 基に顕著な変化が生じないとする報告もある(Van Der Plancken *et al.*, 2005)。DSC サーモグラムより得られた OVA の吸熱量は両サンプルも同等であった (Fig. 6, Table 2)。OVA の S 化は鶏卵の貯蔵過程で生じ、高 pH および高温条件で促進される(Deleu *et al.*, 2015)。また、OVA の S 化はゲル化性に影響することも報告されている(Shitamori *et al.*, 1984)。以上より、OLdLW の調製時に S 化が進行していないか検討を行った。DSC サーモグラムより、両サンプルにて N-OVA および I-OVA のピークの存在は認められたが、I-OVA の増加量は僅かで、S-OVA のピークは認められなかった (Fig. 6, Table 2)。これらを踏まえて、OLdLW の調製時に OVA 分子のアンフォールディングおよび熱的特性の変化は生じていないことを明らかにした。

以上の結果より、加熱および遠心分離により調製した OLdLW は、比較的ネイティブに近い構造を維持した OVA を LW と等量含むことを明らかにした。さらに、OLdLW 溶液は LW と同等の pH で、塩類の添加、透析および凍結乾燥も行っていないため、LW とほぼ同等の塩組成でゲル化性を評価できると考えられた。したがって、OLdLW は LW ゲルの形成における OVA のゲル物性発現への寄与の評価対象として適した試料であると判断された。

3.2 LW ゲルの形成における OVA およびその他タンパク質の役割

加熱ゲルの物性発現に及ぼす OVA およびその他のタンパク質の役割について検討するために、LW および OLdLW についてタンパク質量を調整せずに加熱し、ゲル特性を比較した。その結果、OLdLW ゲルは LW ゲルと比較して、有意に軟らかく、弾力性および復元性は有意に高く、同等の保水性を示すことが認められた (Fig. 7)。また、ゲルの微細構造について、LW は均質な構成単位が密に分散した構造が認められ、OLdLW は細い繊維状の構造を多数含む比較的疎な構造が認められた (Fig. 8)。すなわち、OVA 単体で形成されるゲルは細く繊維状の構造をもつ数珠玉モデル様の疎なネットワークにより構成され、軟らかく弾力性に富んだ物性を示した。その一方で OVA、OVT および LYZ の相互作用で形成されるゲルは、細い繊維状の構造を持たないランダム

凝集モデル様の密度の高いネットワークにより構成され、OVA 単体よりも硬く弾力の小さいゲルを形成した。ネットワークの密度の高さはゲルの硬度に寄与すると考えられ、LW では OVT や LYZ の存在により総タンパク質量が多く、高密度なゲルを形成したと推察された。先行研究において、精製した卵白タンパク質を単体または組み合わせて、総タンパク質量を一定調整してゲル化性を評価した試験の結果より、LYZ を含有するゲルは単体でも組み合わせてもゲルの硬度が高いと報告されている(Johnson & Zabbik, 1981)。したがって、LYZ がゲルの硬度を増強させる要因であると推察された。繊維状のネットワークは OLdLW の特徴構造で、弾力性の発現に寄与するものと推察された。Iwashita らは、LYZ は熱変性 OVA と強く相互作用し、それぞれの単体よりも混合して加熱したほうが凝集体のサイズが顕著に大きくなると報告している (Iwashita *et al.*, 2017)。したがって、ゲル形成時の昇温過程で、LW においては OVT や LYZ が先に凝集体を形成し、その表面に存在する LYZ と熱変性した OVA との結合が促進され、OVA 同士の繊維状ネットワークの形成が阻害され、弾力が低下したものと推察した。また、ネットワーク構造に差異があるにも関わらず、離水率は両サンプルで同等であった。OLdLW ゲルはネットワークに参加するタンパク質が少なく低密度ではあるが、繊維状の構造を多数含むため、ネットワークの表面積が増加し、LW と同等の保水力を示すものと推察された。

ゲルの色調は OLdLW において、LW よりも顕著に透明度が高く、わずかな黄色みが消失し、青みが増加した (Table 3)。ゲルの透明度が減少した要因として、粒子状の構成単位が減少し、ゲルネットワークがランダム凝集モデル様のネットワークの一部が数珠玉モデル様に置き換わり、光の散乱が抑制されたためであると考えられた。また、卵白の黄色みの発現要因は卵白中に微量に含まれるタンパク質の *ovoflavoprotein* と報告されている (Croguennec, Guérin-Dubiard, & Nau, 2007)。同タンパク質は OLdLW の調製過程で除去されたが卵白タンパク質中にわずか 0.8%程度しか含有されないため、電気泳動上では認められなかったと推察された。

以上の結果より、OVA は加熱ゲル形成の主体を担い、ゲルの弾力および保水性の発現に寄与することを明らかにした。さらに、OVA に加えて OVT や LYZ が相互作用することで、茹で卵や目玉焼きにみられる LW 特有の、白色で硬く適度な弾力を有する歯切れのよいゲルが形成されることが示唆された。

第2節 液卵白の加熱ゲル形成における共有結合

本節では、液卵白の加熱ゲル化と化学結合との関係、ならびに物性への影響について明らかにするために、異なる加熱温度におけるタンパク質の凝集に関わる化学結合とゲル特性との関係について検討した。

1. 試料および方法

1.1 試薬

尿素およびアセトニトリル (LC-MS grade)は関東化学株式会社 (東京、日本)より購入した。システイン酸およびランチオンは東京化成工業株式会社 (東京、日本)より購入した。リジノアラニンは Bachem AG. (Bubendorf, Switzerland)より購入した。Albumin from Chicken Egg は Sigma-Aldrich Co. LLC (St. Louis, MO, USA) より購入した。その他の試薬は富士フイルム和光純薬株式会社より購入した。

1.2 試料調製

採卵後3日以内の市販の鶏卵を割卵し、卵白を分離後、ホモジナイザー (広沢鉄工所、東京)で30秒間均質化した。分離した卵白のタンパク質量を Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いてタンパク質濃度 110 mg/mL、pH メーター D-72 LAQUA (株式会社堀場製作所)を用いて 0.1 M HCl にて pH 9.0 に調整後、不溶物除去のため遠心分離 (1,410×g, 15 min)した上澄液を試料とした。

1.3 加熱処理

調製した卵白溶液を 0.2 mL チューブに分注し、サーマルサイクラー (Veriti, Thermo Fisher Scientific)にて 50~100°C、5°C 刻みで 30 分間加熱し、直ちに 20°C まで冷却した。

1.4 ゲル物性測定

加熱したサンプルを Tensipresser MyBoy II system (タケトモ電機)を用いて、直径 2 mm の円柱プランジャーにより圧縮速度 3 mm/s にて 15 %変形時の圧縮応力を測定し、ゲルの硬度とした。

1.5 ゲルの微細構造観察

各試料の中央よりゲルを切り出し、2.5 %グルタルアルデヒドを用いて、室温で一晩固定した。固定後、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)でサンプルを3回洗浄後、50, 70, 80, 90, 95 %の含水エタノールで1回ずつ、100 %エタ

ノールで 2 回段階的に脱水した。脱水後のサンプルは液体窒素にて凍結し切断後、t-ブタノールに置換し凍結乾燥した。乾燥試料を試料台に固定し、オスミウムコーター (HPC-1SW, 株式会社真空デバイス、茨城、日本)にて試料表面にオスミウムを蒸着した。試料の観察は FE-SEM S-4800 (株式会社日立ハイテク)にて行った。

1.6 ゲル分散液の可溶性タンパク質量および濁度測定

加熱した卵白をジルコニアビーズ (Φ 5.0 mm, 安井器械株式会社、大阪、日本)を用いてマルチビーズショッカー (MB1001C, 安井器械株式会社)にて均質化後、50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0)、および 50 mM DTT 含有または非含有の 2 % (w/v) SDS, 3 M 尿素, 1 mM EDTA を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0)に分散させた。懸濁液をインキュベート (37°C, 60 min)後、600 nm における吸光度を測定し、濁度とした。さらに、遠心分離 (16,000×g, 5 min, 20°C)により得た上澄液の 280 nm における吸光度を測定し、Albumin from Chicken Egg を標準試薬として、タンパク質濃度 (mg/mL)を算出した。

1.7 SH 基、ランチオニン (LAN)およびリジノアラニン (LAL)の定量

遊離 SH 基量は Ellman (1958)の方法を一部改変して測定した。加熱試料を凍結乾燥し、2 % (w/v) SDS、3 M 尿素、1 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)を含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5)に分散し、振盪 (25°C, 180 rpm, 60 min)した。次に、同溶液に溶解した 1.0 mg/mL DTNB を加え、振盪 (25°C, 180 rpm, 15 min)した。遠心分離 (25°C, 11,000×g, 5 min)後、412 nm における吸光度を測定し、L-システインを標準品として SH 基量を求めた。凍結乾燥した試料を 6 M 塩酸と混和し、インキュベート (24 h, 110 °C)することによりペプチド結合を加水分解後、加水分解後の試料を濃縮遠心機で乾固し、0.1 M 塩酸に溶解した。全 SH 基量測定用試料のみ、ギ酸を添加し、静置 (4°C, 16 h) することによりシステインおよびシスチンをシステイン酸に酸化後、塩酸にて加水分解した。調製した溶液をナイロンフィルター Torast Disc (0.22 μ m; 株式会社島津ジーエルシー、東京、日本)にてろ過し高速液体クロマトグラフィー/四重極-飛行時間型質量分析計 (LC-Q-TOF; Agilent 1260 Infinity series-MS/MS 6563 Accurate-MASS; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) により分析した。分析カラム Intrada Amino Acid column (100 × 2 mm, 2.7 μ m, インタクト株式会社, 京都, 日本)を使用し、35°C で維持した。移動相は 0.1 % ギ酸を含むアセトニトリル (A)および 100 mM ギ酸アンモニウム水溶液 (B)を用いた。移動相の流速は 0.4 mL/min、グラジエント条件について移動相 B の割合は、分析開始より 0~3min は 86 %で維持し、3~10 min の間は 0 %まで

直線的に減少させ、10~15 min の間は 0% で維持した。Q-TOF は ESI のポジティブイオンモード、ネブライザーガスは 50 psig、乾燥ガスは 6 L/min, 300°C、フラグメンター は 175 V に設定した。LAN および LAL は各々の標準試薬を、一般アミノ酸の定量にはアミノ酸混合標準液 H 型 (富士フイルム和光純薬株式会社) を使用して各化合物量を算出した。なお、全 SH 基はネガティブイオンモードにて実行し、検出したシステイン酸量を総 SH 基量として計算した。

1.8 SDS-PAGE

加熱した卵白をジルコニアビーズ (ϕ 5.0 mm, 安井器械株式会社) を用いてマルチビーズショッカー MB1001C (安井器械株式会社) にて均質化後、還元 SDS-PAGE 用の試料は 50 mM DTT、2% (w/v) SDS、3 M 尿素、1 mM EDTA を含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) に、非還元 SDS-PAGE 用の試料は 2% (w/v) SDS、3 M 尿素、1 mM EDTA を含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) に分散し、それぞれを半量の 50 mM DTT 含有または非含有の 60% グリセロール、3% SDS、0.01% ブロモフェノールブルーを含む 60.6 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 6.8) と混和し、静置 (25°C, 24 h) した。電気泳動は Laemmli (1970) の方法を一部改変して行った。電気泳動には 5-20% e-pagel (アトー株式会社)、分子量マーカー (XL-ladder broad; 株式会社アンテグラル、徳島、日本) を用いた。One step CBB 染色液 (株式会社バイオクラフト、東京、日本) にてタンパク質バンドの染色を行った。

1.9 統計解析

全結果は 3 回反復試験の平均値として表示し、統計解析には Statcel 4 を使用した。3 群以上間の検定には Tukey-Kramer 法 ($p < 0.05$) を適用した。

2 結果

2.1 加熱温度とゲル化性

卵白溶液を各温度で加熱し目視にて観察した結果、未加熱で観察される透明溶液は 60°C 以上の加熱で白濁した (Fig. 9)。チューブの下部を持ち軽く振ると、60~70°C 加熱試料は白濁の凝集物が蓋側に移動したことから、溶液がゾル状に変化したと認められた。一方、75°C 以上で加熱した試料では、白濁の凝集物は流動性を失い、ゲルの形成が認められた。ゲルの硬度は 75°C で最も小さく、加熱温度が高いほど大きくなる傾向が認められた (Fig. 10)。

2.2 ゲルの微細構造観察

いずれの試料の微細構造においても球状のゲルネットワーク構成単位が観察された (Fig. 11)。75°C 加熱試料では構成単位が大きく疎に分散する像が観察された。一方、80°C 以上で加熱した試料では、小さな構成単位が緻密に分散した像が観察された。しかし、80°C~100°C 加熱試料間に顕著な差異は認められなかった。

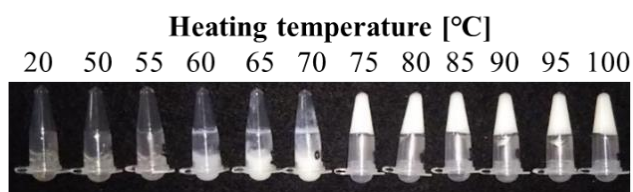


Fig. 9 Heat-induced sol and gel formation of LW

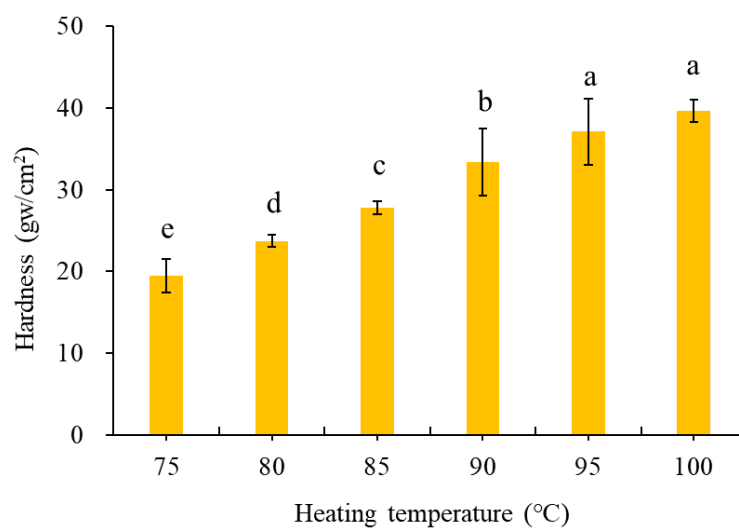


Fig. 10 Gel hardness of heat treated LW gel. Data are shown as mean \pm SD ($n = 15$). Different letters indicate statistically significant differences at $p < 0.05$.

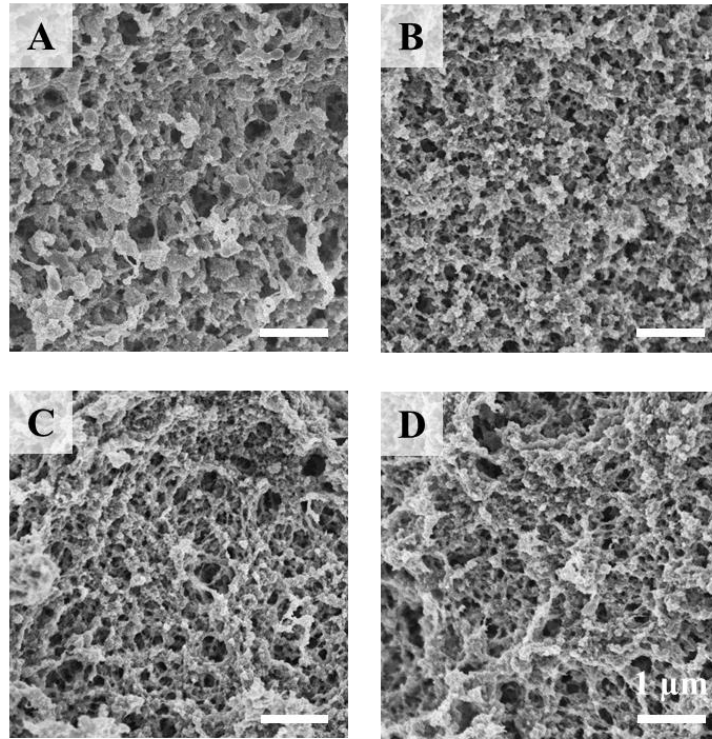


Fig. 11 Gel microstructure of LW gel observed by SEM. The gels were prepared by heating for 30 min at 75°C (A), 80°C (B), 90°C (C), and 100°C (D).

2.3 ゲル分散液の可溶性タンパク質量および濁度

0.1 M Tris-HCl 緩衝液および 2 % SDS、3 M 尿素、1 mM EDTA 含有 0.1 M Tris-HCl 緩衝液にて処理した試料において、60°C~85°C にかけて溶解性が顕著に減少する傾向が認められ、中でも 0.1 M Tris-HCl の方が可溶性タンパク質量は少なかった (Fig. 12A)。一方、50 mM DTT、2 % SDS、3 M 尿素、1 mM EDTA 含有 0.1 M Tris-HCl 緩衝液において、75°C 以上で可溶性タンパク質量が低下したが、他の溶媒ほどの低下は見られなかった。

0.1 M Tris-HCl 緩衝液分散試料の濁度は 60°C から 75°C にかけて顕著に増加し、75°C 以上で漸増した (Fig. 12B)。2 % SDS、3 M 尿素、1 mM EDTA 含有 0.1 M Tris-HCl 緩衝液分散試料の濁度は 60°C から 70°C にかけて顕著に増加し、75°C から 90°C にかけても増加傾向が認められた。50 mM DTT、2 % SDS、3 M 尿素、1 mM EDTA 含有 0.1 M Tris-HCl 緩衝液分散試料の濁度は 80°C 以下では変化がなく、85°C 以上で増加が認められた。100°C 加熱試料間で比較すると、Tris-HCl 分散試料は最も濁度が高く、DTT、尿素および SDS 含有 Tris-HCl 分散試料は最も濁度が小さかった。

2.4 タンパク質構成アミノ酸および LAN・LAL の定量

遊離 SH 基は加熱に伴い減少傾向を示し、100°C では未加熱と比較して 68.2 % 減少した (Table 4)。全 SH 基量は(遊離と SS 形成 SH の合計)70°C 以下では変動が認められなかったが、75°C 以上で加熱温度の増加に従い減少傾向が認められ、未加熱と比較して 100°C において 28.4 % 減少した。一方、セリンは未加熱と比較して 100°C において 2.2 % の減少にとどまり、顕著な変動は認められなかった (Table 4)。

LAN 結合は 65°C 以上、LAL 結合は 85°C 以上で検出され、両者とも加熱温度の上昇に従い増加した (Table 4)。いずれの温度においても LAN 結合量は LAL 結合量よりも多く、100°C 加熱試料において LAN 結合は LAL 結合の 13 倍生成した。LAN および LAL 結合とゲル硬度の間に、それぞれ 0.990、0.823 と非常に強い正の相関 ($p < 0.05$) が認められた。

さらに、100°C 加熱試料において、LC-Q-TOF のデータより、類似構造を有する 3-メチルランチオニンに相当する m/z 223.0747 における EIC クロマトグラム上のピークは LAN および LAL 結合よりも顕著に小さかった (Fig. 13)。

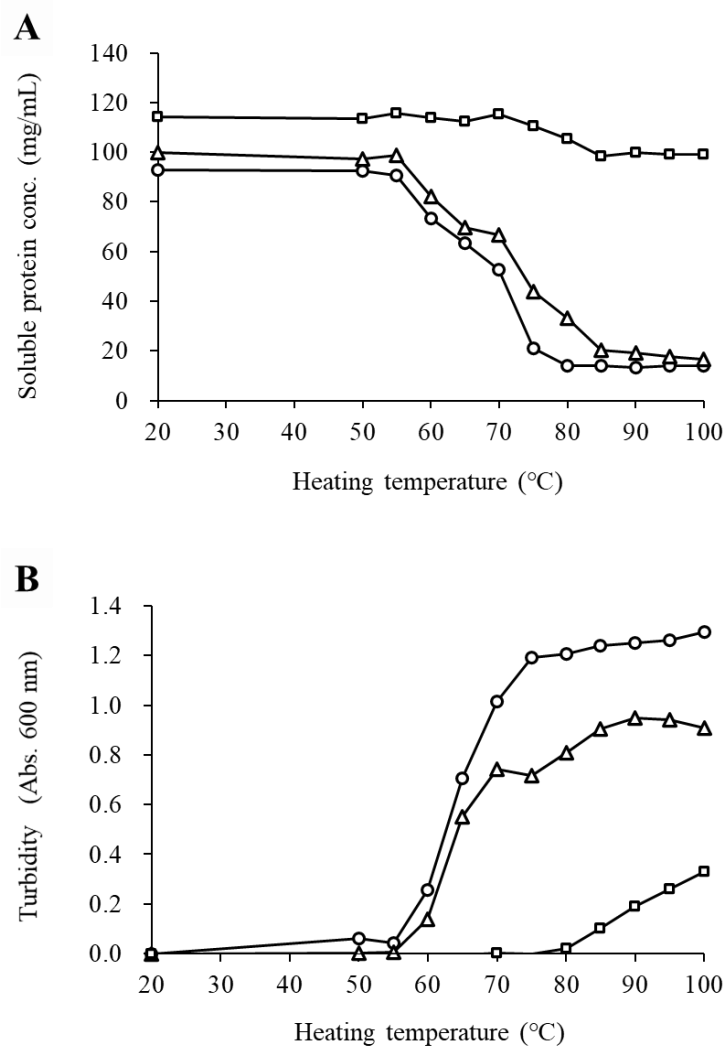


Fig. 12 Thermally induced changes on soluble protein concentration (A) and Turbidity (B) of LW. The samples were treated with 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0): containing no additives (open circle); 3 M urea, 2 % SDS (w/w) and 1 mM EDTA (open triangle); and 50 mM DTT, 3 M urea, 2 % SDS and 1 mM EDTA (open square).

Table 4 Thermal changes of LAN and LAL bonds and related amino acids

Temperature (°C)	Free SH	Total SH	Serine	LAN	LAL
20	50.7±0.8	204±3	544±4	0±0	0±0
50	49.7±0.5	202±2	536±5	0±0	0±0
55	49.9±0.7	207±5	547±6	0±0	0±0
60	48.2±0.9	204±3	546±5	0±0	0±0
65	45.8±1.1	204±5	550±5	0.5±0.2	0±0
70	38.1±0.5	207±3	542±2	4.8±1.0	0±0
75	25.4±0.7	200±3	550±6	7.7±1.6	0±0
80	24.0±1.0	199±3	538±7	12.8±1.6	0±0
85	18.9±0.1	191±2	545±6	18.2±2.6	0.2±0.1
90	16.7±0.2	175±1	548±5	26.6±4.7	0.4±0.2
95	16.1±0.4	173±1	527±9	35.4±4.1	1.2±0.6
100	16.1±0.4	146±5	532±3	41.8±5.1	3.2±0.4

Data are shown as mean ± SD (n = 3). Free SH, cysteine residue not forming SS bond, Total SH, Free SH and cysteine residue which form SS bond; LAN, lanthionine; LAL, lysinoalanine.

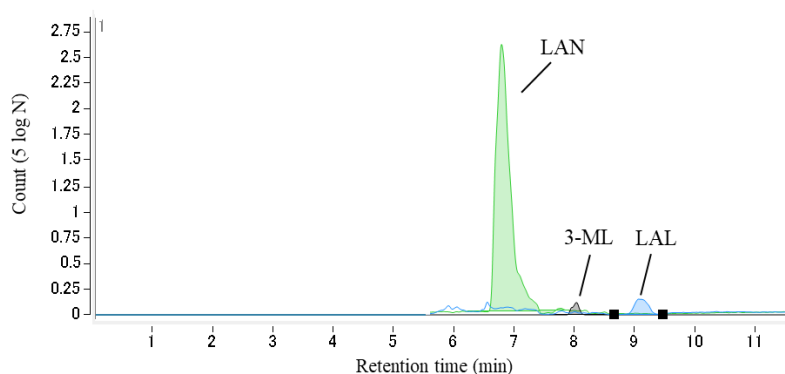


Fig. 13 Extract ion chromatogram obtained from LC/Q-TOF analysis data of LW sample heated at 100°C. The chromatograms were extracted at m/z 209.0591 (LAN, lanthionine), 223.0747 (3-ML, 3-methylanthionine) and 234.1448 (LAL, lysinoalanine).

2.5 SDS-PAGE による加熱凝集挙動の解析

加熱した試料を還元および非還元 SDS-PAGE に供し、各バンドの染色強度をデンストグラムにて数値化した (Fig. 14, Fig. 15)。

非還元 SDS-PAGE の結果、未加熱試料において OVA、OVT および LYZ の単量体バンドが認められた。この条件下において、LYZ は 60°C、OVT は 65°C、OVA は 75°C にて単量体バンドの大半が消失し、各温度で共有結合を伴う凝集が生じたと示された。しかし、高分子領域にバンドは認められなかった。一方、還元 SDS-PAGE についても、未加熱試料において OVA、OVT および LYZ の単量体バンドが認められた。非還元条件と比較して還元条件下では、加熱に伴う各バンドの減衰挙動は緩やかであった。還元条件下では、OVT のバンドが最も減衰が早く、95°C 以上においてバンドは検出されなかった。100°C 加熱試料において、未加熱のバンド強度と比較して LYZ は 44%、OVA は 26% の減衰が認められた。

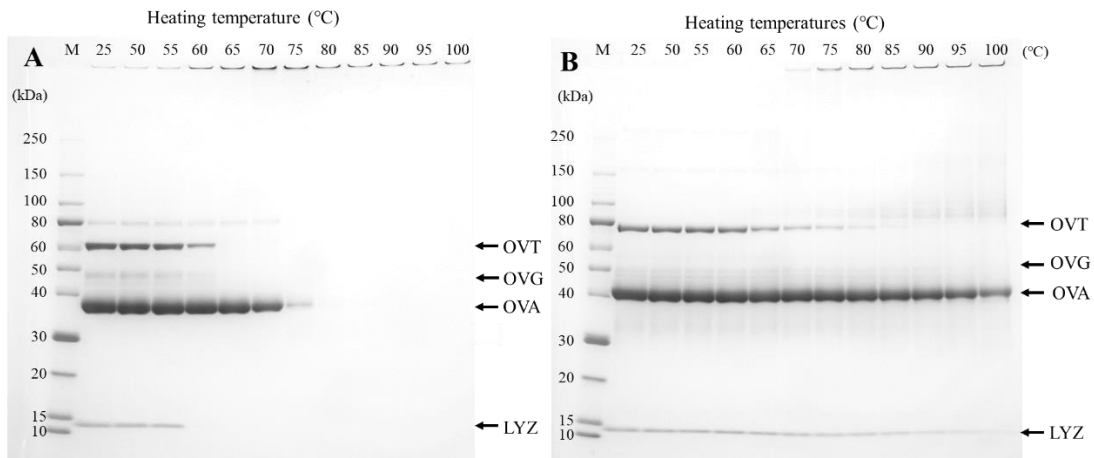


Fig. 14 SDS-PAGE analysis for heat-treated LW suspended in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 3 M urea, 2 % SDS (w/w) and 1 mM EDTA without or with 50 mM DTT. The suspension with or without DTT were analyzed by non-reducing (A) or reducing (B) SDS-PAGE. OVT, ovotransferrin; OVG, ovoglobulins; OVA, ovalbumin; LYZ, lysozyme.

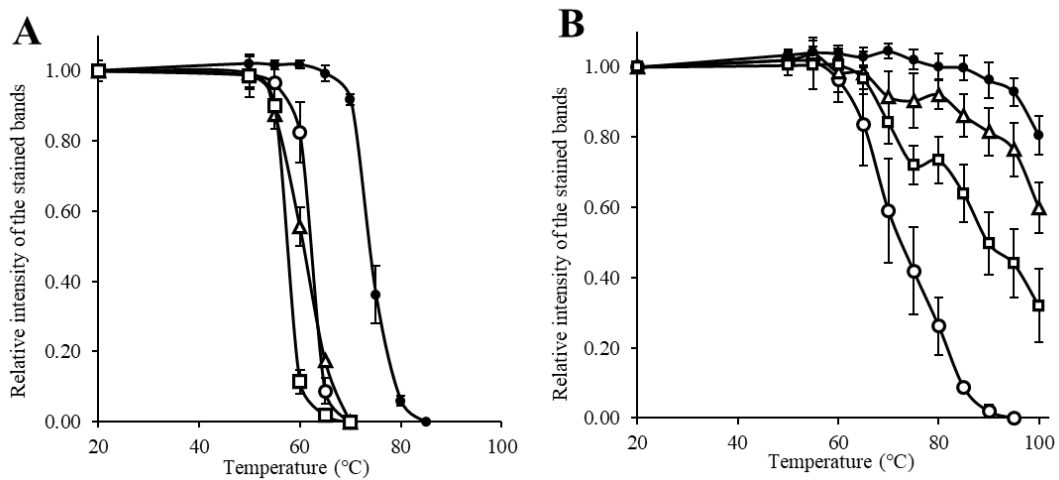


Fig. 15 Changes in relative intensity of the SDS-PAGE bands in non-reducing (A) or reducing (B) conditions. OVT, ovotransferrin (open circle); OVG, ovoglobulins (open triangle); OVA, ovalbumin (closed circle); LYZ, lysozyme (open square).

3 考察

本節では、液卵白の加熱ゲル化と化学結合との関係、ならびに物性への影響について検討した。卵白溶液は 60°C 以上の加熱で白濁しゾル状に変化し、75°C 以上で加熱した試料では、ゲル形成を確認した (Fig. 9)。ゲルの硬さは 75°C で最も小さく、加熱温度が高いほど増加する傾向が認められた (Fig. 10)。これらの試験結果は、加熱温度とゲル硬度との関係を示した先行研究と一致した傾向を示した (Beveridge *et al.*, 1980; Gossett, Rizvi & Baker, 1984)。これらの微細構造を観察すると、75°C 加熱試料において構成単位が大きい疎なネットワークが認められた (Fig. 11)。一方、80°C 以上の加熱試料においては総じて構成単位が小さい緻密なネットワークが観察されたが、試料間に顕著な差異は認められなかった。異なる pH で調製した卵白ゲルについて、硬い物性を示すものほど構成単位が小さく、緻密なネットワークを形成する関係がみられている (Handa *et al.*, 1998)。以上より、75°C 加熱試料よりも、80°C 以上加熱試料のゲルが硬くなる現象の一因はネットワーク構造の差異によると推察された。その一方で、80°C 以上で加熱したゲルが加熱温度依存的に硬くなる現象はネットワーク構造以外の要因により生じると推察された。

そこで、ゲル形成に関わる化学結合に着目した。非共有結合および共有結合について各試薬の性質より、50 mM Tris-HCl 緩衝液は両結合を切断せず、2% (w/v) SDS, 3 M 尿素, 1 mM EDTA を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液は非共有結合を切断、50 mM DTT, 2% (w/v) SDS, 3 M 尿素, 1 mM EDTA を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液は非共有結合に加え、SS 結合を切断するものと判断できる。この性質を利用し、ゲル形成におけるタンパク質の凝集に関与する各結合の寄与を推定した。濁度測定の結果より、分子間相互作用と SS 結合による凝集は同じ温度帯で生じることが示唆され、ゲルが形成された 75°C 以上における濁度の形成には、SS 結合の寄与度が高いことが示された (Fig. 12)。さらに、85°C 以上において SDS、尿素および DTT を含む Tris-HCl 緩衝液への溶解性の低下および濁度の増加が認められた。この結果は、加熱した卵白タンパク質を尿素および 2-メルカプトエタノールにて処理した際、可溶性タンパク質量は加熱温度が高いほど低下するとの報告を支持した (Beveridge *et al.*, 1980)。この先行研究と本試験との相違点は、タンパク質の可溶化に尿素および還元剤に加えて SDS を併用している点である。そのため、非共有結合が十分に解離し SS 結合の切断効率が增加すると推定され、実際に本試験の方がタンパク質の可溶化率が高かった。以上より、SS 結合とは異なる共有結合も卵白加熱ゲルの形成に寄与することを改めて示した。

タンパク質の分子間への形成が報告される SS 結合以外の共有結合には、グルタミン酸とリジンが架橋したイソペプチド結合、メイラード反応により形

成される結合など、様々な報告がある(Gerrard, 2002)。緒論で述べたとおり、卵白にはグルコースが含有されることから、メイラード反応による共有結合の形成も推定されるが、本試験の条件下にてメイラード反応に伴い生じる褐変は認められなかったため、同結合は主要因ではないと推察した。そのほかの共有結合として、タンパク質の高温での殺菌等の処理によりランチオニン(LAN)やリジノアラニン(LAL)が生じると報告されている(Friedman, 1999)。LALについては、様々な解析がなされ、牛乳、大豆および鶏肉をはじめとするタンパク質に富んだ製品の高温またはアルカリ処理により生成することが報告されてきた(Maga, 1984)。一方、LANについては、食品では牛乳や小麦において生成が認められているが、食品以外の毛髪や羊毛、乳酸菌の産生するナイシン A のような抗菌性ペプチドにおける研究が主体であった(Friedman, 1999; Lubelski *et al.*, 2008; Rombouts *et al.*, 2016)。加熱した卵白タンパク質の酸加水分解後、LANは薄層クロマトグラフィーにて、LALはHPLCまたはGC-MSにてそれぞれ確認されている(Germs, 1973; Hasegawa & Iwata, 1982)。以上より、LANおよびLALはゲル形成に寄与するSS結合以外の共有結合の候補と考えられたため、その定量を行った結果、両結合とも生成が認められた。本試験のLWの加熱においては、LANの生成が優勢で、生成開始温度が20°C低く、生成量は100°C加熱試料においてLALの13倍であった(Table 4)。先行研究において、水溶液で加熱したLYZ、 α -ラクトグロブリン、小麦グリアジンおよびウシ血清アルブミンの分析のLANおよびLAL分析においても、LANの方が多量に生成することが認められており、本研究は同様の傾向を示した(Hasegawa & Iwata, 1982; Rombouts *et al.*, 2016)。また、20分間煮沸した卵白中においてLANが10 $\mu\text{mol/g}$ 生成することが薄層クロマトグラフィーで確認されている(Germs, 1973)。LALにおいては卵白を30分煮沸することで5.14~6.00 $\mu\text{mol/g}$ 生成することがGC/MSおよびHPLCで確認されている(Hasegawa *et al.*, 1987)。これらの先行研究と比較して、本研究ではLAN量が顕著に多いが、これはTLC分析方法の差異によるものと推定された。さらに、類似した機構にて生成するとされ、標準品が市販されていない3-メチルランチオニンについてもm/z値を利用して比較した結果、そのピーク強度はLANおよびLALよりも顕著に小さかった(Fig. 13)。以上の結果より、卵白の加熱ゲル化において生成する還元不可逆的な共有結合の主体はLAN結合であることが示された。さらにLAN結合量はゲル硬度と非常に強い正の相関を示したことから、加熱温度に従ったゲルの硬度増加にはLANが寄与するものと推察された。LANは還元不可逆的で、熱安定性の高い結合であると言及されている(Suda *et al.*, 2010)ため、還元可逆的で架け替えの生じるSS結合よりも結合が強固であると推察される。このことが硬度増加の一要因と推定された。

次に、LAN および LAL 結合の形成に由来するアミノ酸の特定を試みた。LAN および LAL 結合は、以下の 2 反応により生成すると報告されている(Fig. 16, Friedman, 1999)。まず、システイン(遊離 SH 基または SS 結合として存在)またはセリンの側鎖が加熱またはアルカリ処理により β -脱離してデヒドロアラニンが生成する。そしてこのデヒドロアラニンに遊離 SH 基として存在するシステインがマイケル付加すると LAN が、リジンがマイケル付加すると LAL が生成するとされる。そこで、デヒドロアラニン生成に寄与するアミノ酸を定量した。その結果、遊離 SH 基および全システイン量は顕著に減少したが、セリン量に顕著な変動は認められなかったことより、LAN 結合は遊離 SH 基または SS 結合より生成することが示された (Table 4)。LAN 結合が全てシステインより生じ、全システイン 2 分子より生成したと仮定すると、LAN 結合は未加熱の総 SH 基の 40.8 %にも相当し、同結合は量的にも十分にゲル形成に寄与しうることが示された。

SDS-PAGE におけるバンドの減衰および消失は、還元条件については SS 結合以外の共有結合、すなわち LAN 結合による凝集を示すと推察される。一方、同現象は非還元条件では共有結合による凝集が推察され、還元条件の挙動との差分により SS 結合による凝集が推察される。これを踏まえると、SS 結合による凝集は OVA、OVT および LYZ はそれぞれ 75°C、65°C および 60°C にて急激に生じたと推察された。一方、LAN 結合による凝集はいずれのタンパク質においても SS 結合の形成よりも高い温度で生じ、その生成挙動は緩やかであった。さらに、LAN 結合は OVT、LYZ、OVA の順に形成しやすく、OVT は 95°C 以上の加熱試料において単量体が認められなかった。LAN 結合の基質であるシステイン残基は、各タンパク質当たりに OVT は 30、LYZ は 8、OVA は 6 個含有され、OVA のうち 4 個が遊離 SH であるほかは全て SS 結合として存在している(Alleoni, 2006)。またグルタチオンを用いた試験より、SS 結合の方が β -脱離しやすいとの報告もある(Finley *et al.*, 1982)。以上の要因により、LAN 結合は分子内 SS 結合が圧倒的に多い OVT にて最も形成され、OVA よりも LYZ において形成されたと推察された。また、OVT および LYZ が LAN 結合の形成主体であったことから、第 1 節にて認められた、両者による卵白ゲルの硬度増加および弾力低下には LAN 結合が寄与している可能性も推察された。

以上の結果より、卵白の加熱ゲル化には共有結合の LAN 結合も寄与することを明らかとした。同結合は加熱温度の上昇に従い増加し、ゲルの硬度と強い正の相関が認められた。LAN はいずれのタンパク質においても形成され、特に OVT において顕著に生成した。

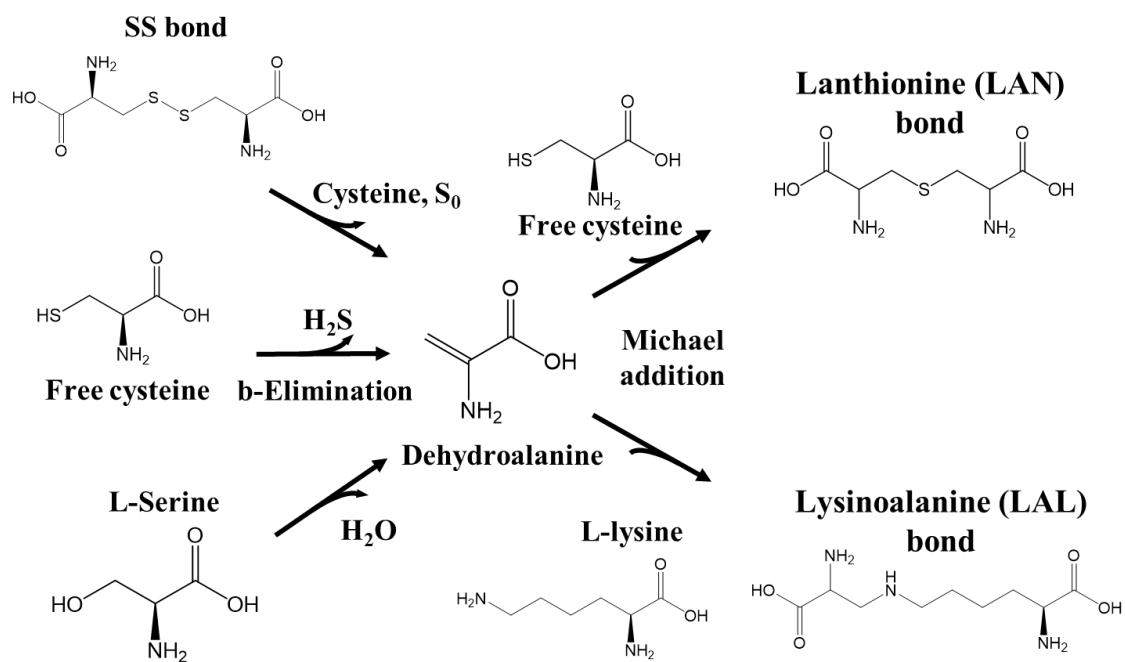


Fig. 16 Generation mechanisms for LAN and LAL bonds.

要約

鶏卵卵白は優れた加熱ゲル化性を有し、食品産業にて重用されている。卵白の加熱ゲルネットワークはタンパク質の変性によって生じる分子同士の凝集により形成される。ゲルの物性発現には、ネットワークや化学結合が重要な役割を果たすとされる。これらの要素にはタンパク質の種類も影響するが、十分な検討はなされていない。本章では液卵白の加熱ゲル化機構に関して、各タンパク質のゲル物性発現への寄与、およびゲル形成に寄与する共有結合を明らかにすることを目的に研究を進めた。

ゲル形成における各タンパク質の寄与について検討を行った。主要な方法にて生成した OVA 加熱ゲルの硬さおよび復元性には大きな差異が認められたため、種々の精製法で調製したタンパク質では異なる変性が生じ、卵白におけるゲル物性発現要因の解明には不適と判断した。そこで、加熱(64°C, 10 min)および遠心分離により、LW と未変性の OVA を等量含有する OVT-LYZ 除去液卵白 (OLdLW)を調製後、加熱ゲル化特性を比較した。その結果、卵白の主要タンパク質である OVA は単体でゲル形成能を有し、そのネットワークは繊維状構造を多数含有する疎な構造で、透明度が高く、軟らかく高い弾力および保水力を示すことを明らかにした。さらに OVA に加えて OVT や LYZ が相互作用することで、球状の均質な構成単位による密度の高いネットワークを形成し、茹で卵や目玉焼きにみられるような、白濁が強く、硬く適度な弾力の歯切れのよいゲルが形成されることが示唆された。

次に、LW の加熱ゲル形成に寄与する化学結合について検討した。50~100°C の各温度で加熱した LW は、75°C 以上で完全に流動性を失いゲル化が認められ、加熱温度に従いゲルが硬くなった。ゲルを破砕および均質化し、尿素、SDS または DTT を含む Tris-HCl 緩衝液にて処理し、非共有結合または SS 結合を切断した試料の濁度測定の結果より、ゲルの形成には非共有結合および SS 結合に加えて、それ以外の共有結合の寄与することが示唆された。そこで、その他の結合を明らかにするために、各試料を酸加水分解し、LC-Q-TOF にて分析したところ、LAN 結合が 65°C 以上で加熱温度に従い増加し、ゲルの硬度と非常に強い正の相関を示すことを示した。LAN 結合の生成にはシステイン残基が主に寄与することを明らかにした。さらに、還元 SDS-PAGE の結果より、LAN 結合はいずれのタンパク質においても形成され、中でも OVT にて顕著に生成しやすく、OVA にて形成しにくいことを明らかにした。以上より、卵白の加熱ゲル化には従来 SS 結合が主に寄与すると提唱されてきたが、LAN 結合もゲルの形成に寄与することを明らかにした。同結合は特に OVT や LYZ において形成され、ゲルの硬さ発現に寄与するものと示唆された。

第2章 乾熱処理乾燥卵白の高硬度ゲル形成能

1. 試料および方法

1.1 試薬

Sequencing Grade Modified Trypsin は Promega Co. より購入した。その他、各試薬の入手元は、第1章と同一とした。

1.2 試料

試料の乾燥卵白 (DEW)には、キューピータマゴ株式会社 (東京, 日本)より供与された脱糖および噴霧乾燥後、乾熱処理した試料 (HDEW, Heated Dried Egg White)および乾熱未処理の試料 (NDEW, Non-heated Dried Egg White)を用いた。

1.3 加熱処理

乾燥卵白を純水に溶解し、6 M HCl または 5 M NaOH 溶液で pH を 7.0 ± 0.1 に調整後、遠心分離して不溶物を除去し、Sumigraph NC220-F (株式会社住化分析センター、大阪, 日本)の測定値によりタンパク質濃度を調整した。DEW 溶液を加熱 (40~90°C, 5°C intervals, 30 min)後、室温まで急冷し、種々の試験に供した。

1.4 ゲル形成温度測定

タンパク質濃度 10% (w/w)の DEW 溶液を調製後、各温度で加熱し、第1章第2節、1.4 ゲル物性測定の方法に従い、硬度を測定し、ゲル形成温度を求めた。

1.5 ゲルの微細構造観察

タンパク質濃度 10% (w/w)の DEW 溶液を 80°C 加熱し調製した DEW について、第1章第2節、1.5 ゲルの微細構造観察と同一の手法で、FE-SEM S-4800 にて微細構造観察を行った。

1.6 動的光散乱法

タンパク質濃度 0.01% (w/w)の溶液を加熱処理し、ナイロンフィルター Torast Disc (0.22 μm , 株式会社島津ジーエルシー)にてろ過後、ディップセルを使用して、Mobius (Wyatt Technology Co., Santa Barbara, CA, USA)に供し、ゼータ電位および平均粒子半径を測定した。

1.7 ポリアクリルアミドゲル電気泳動

10%(w/w) DEW 溶液を各温度で加熱後、一部を精秤し、マルチビーズジョッカー MB1001C にて均質化した。

Blue-Native PAGE (BN-PAGE) は Schagger, & von Jagow (1991)の方法を一部改変して行った。均質化したサンプルを 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)に懸濁し、200 mM NaCl, 40 % グリセロール, 0.004 % Ponceau S を含む 200 mM BisTris 緩衝液 (pH 7.0)と混合した。調製した試料液および NativeMark Unstained Protein Standard (Thermo Fisher Scientific)を NativePAGE Bis-Tris Gel System 3-12% (Thermo Fisher Scientific)にアプライし、電気泳動に供した。

SDS-PAGE は Laemmli (1970)の方法を参考に一部改変して行った。破碎したサンプルを還元 SDS-PAGE 用の試料は 50 mM DTT、2%(w/v) SDS、3 M 尿素、1 mM EDTA を含む 100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0)に、非還元 SDS-PAGE 用の試料は 2%(w/v) SDS、3 M 尿素、1 mM EDTA を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に分散した。以降の操作は、第 1 章第 2 節、1.8 SDS-PAGE に従った。

Tricine SDS-PAGE は Schagger, & von Jagow (1987)の方法を一部改変して行った。泳動ゲルには p-pagel (アトー株式会社)を使用し、陽極側に 0.1 % SDS 含有 0.1 M Tris-0.1 M Tricin 緩衝液 (pH 8.2)を、陰極側に 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.9)を使用した。

1.8 表面疎水性測定

DEW 溶液のタンパク質濃度を 0.01 %に調製し、1.1.1.4 表面疎水性測定の方法に従い測定した。

1.9 円偏光二色性 (CD)分光法

pH 7.0 の 50 mM リン酸緩衝液に溶解したタンパク質濃度 0.01 % (w/w)の DEW 溶液の未加熱および 80°C で加熱試料を試験に用いた。222 nm における CD スペクトルを J-720 型円二色性分散計(日本分光、東京、日本)にて測定し、得られた CD スペクトルより分子橢円率を求めた。

1.10 陰イオン交換 HPLC

陰イオン交換 HPLC は HPLC システム (10 A, 島津製作所、京都、日本)に IEC DEAE-825 (8.0×75 mm, 8.0 μm; 昭和電工、東京、日本)を装着して行った。2.0 % (w/w)に調整した DEW 溶液を HPLC システムに供し、移動相は 10 mM リン酸 Na 緩衝液(pH 7.0, 移動相 A)および 1.0 M NaCl 含有 10 mM リン酸 Na 緩衝液(pH 7.0, 移動相 B)を使用し、流速 1.0 mL/min にて分析した。移動相の

グラジエント条件については、移動相 B の割合は分析開始から 3 min までは 0 %に維持し、3 min から 20 min にかけて 100 %まで直線的に増加させた。タンパク質の検出には 215 nm における吸光度を測定した。分析試料を 30 sec ごとに分画し、両者のタンパク質組成を BN-PAGE にて分析した。

1.11 SH 基、LAN および LAL の定量

第 1 章第 2 節、1.7 SH 基、LAN および LAL の定量に従い測定した。

1.12 ゲル内消化法によるタンパク質の一次構造同定

Tricine-SDS PAGE にて分離したタンパク質バンドを切り出し、30 %アセトニトリル含有 25mM 重炭酸アンモニウム溶液にて脱色後、10mM DTT を含む 25mM 重炭酸アンモニウム溶液にてタンパク質の SS 結合を還元し、55mM ヨードアセトアミドを含む 25mM 重炭酸アンモニウム溶液によりシステイン残基のカルバミドメチル化を行った後、0.1 $\mu\text{g/ml}$ Sequencing Grade Modified Trypsin にてインキュベート (37°C、12 h)した。5 %ギ酸を含む 50 %アセトニトリル溶液にて反応停止後、抽出した消化物を Hydrophilic PTFE syringe filter (0.22 μm ; Hawach Scientific Co., Ltd., Shaanxi, China)に通し、Agilent 1260 Infinity series-MS/MS 6563 Accurate-MASS Q-TOF LC/MS (Agilent Technologies)にて LC-MS-MS 分析を行った。分析カラムは AdvanceBio Peptide Mapping (120 \AA , 2.1 x 150 mm, 2.7 μm)を使用した。移動相は 0.1 %ギ酸水溶液 (A)および 0.1 %ギ酸を含むアセトニトリル (B)を用い、流速は 0.4 mL/min とした。移動相のグラジエント条件について、移動相 B の割合を分析開始時は 0 %、15 min で 40 %まで上昇させ、18 min までに 90 %まで増加させた。Q-TOF は ESI のポジティブイオンモード、ネブライザーガス(40 psig)、乾燥ガス(6 L/min, 300°C)、フラグメンター(150 V)に設定した。MS/MS 分析は二価以上に荷電した化合物に適用した。データ解析はタンパク質配列解析データベース UniProtKB の Gallus gallus (Chicken)を使用して Mascot Server (Matrix Science Inc., Boston, MA, USA) の MS/MS ion search モードにてタンパク質の同定を行った。

さらに、同定されたタンパク質の化学・構造的特性を関連付けた解析をするために、アミノ酸配列からタンパク質の特性をシミュレーションする ProtScale (SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Lausanne, Switzerland) の Hydropathy plot にて Kyte & Doolittle の方法に基づいて疎水性および親水性指標を求めた。

1.13 統計解析

全ての試験は少なくとも 3 反復で行い、測定値は平均値 \pm 標準偏差で表示

た。有意差検定は統計解析ソフト statcel 4 (OMS Publishing Inc., Tokyo, Japan) を用いて 2 群間の検定には Student の t 検定を、3 群間以上の有意差検定には Tukey-Kramer の検定を行った。

2. 結果

2.1 ゲル形成温度およびゲルの硬さ測定

DEW 溶液を各温度で加熱後、ゲルの硬度測定によりゲル形成温度を求めた (Fig. 17)。その結果、ゲルの形成は NDEW において 75°C、HDEW において 60°C にて認められ、ゲル形成温度は乾熱処理により 15°C 低下した。また、NDEW および HDEW とともに加熱温度が高いほどゲル硬度は増加傾向が認められた。NDEW と比較して、HDEW ではゲル硬度は 75°C において 9.0 倍、85°C において 3.6 倍硬く、HDEW は比較的低温から強固なゲルを形成することが明らかとなった。また、70°C の加熱により形成された HDEW ゲルは 90°C 加熱により調製された NDEW ゲルよりも硬いことから、NDEW がゲルを形成できない温度においても NDEW の最大硬度を上回るゲルの形成が認められた。

次に DEW 溶液の各温度での加熱による変動を目視で観察した (Fig. 18)。いずれの試料とも加熱に伴い白濁が認められた。NDEW においては 55°C から 60°C にかけて急激に強く白濁した。一方 HDEW においては 55°C 付近から増加傾向が観察されたが、白濁度の増加は極めて緩やかで、いずれの温度においても NDEW と比較して透明度高かった。以上より、HDEW 水溶液を加熱すると、硬く透明度の高いゲルの形成が認められた。

2.2 SEM による微細構造観察

80°C での加熱により調製した加熱ゲルについて、SEM による構造観察を行った (Fig. 19 A-D)。NDEW (Fig. 19 A, C) では、巨大凝集体を構成単位とした、粗でランダムなネットワークが認められた。一方、HDEW (Fig. 19 B, D) では、微小な凝集体を構成単位とした、緻密で均質なネットワークが観察された。各 DEW ゲルの構成単位の粒子半径を画像解析により求めた結果、NDEW の 223.6 ± 36.7 nm に対して、HDEW はその約 12 分の 1 に相当する 18.2 ± 2.6 nm と有意に小さい ($p < 0.01$) ことが示された。

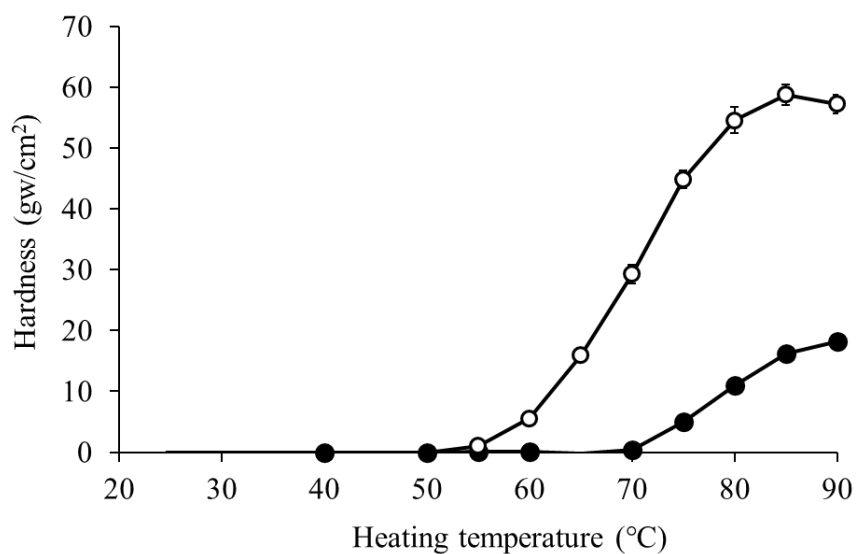


Fig. 17 Changes in the gel hardness of DEW solutions of NDEW (filled circles) and HDEW (open circles) at different temperatures.

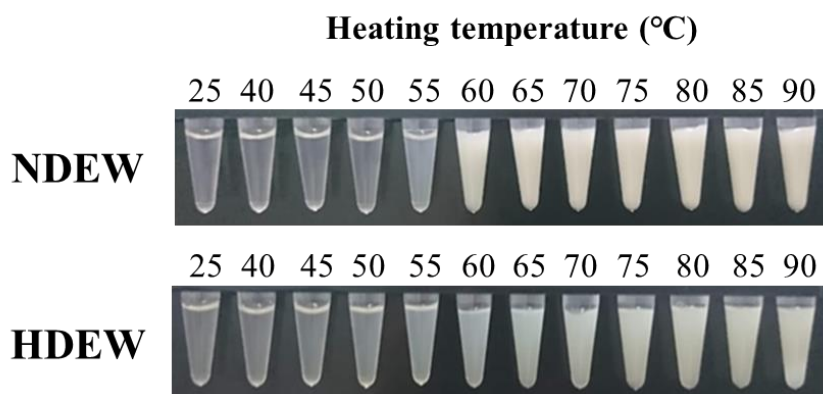


Fig. 18 The appearance of the NDEW (upper) and HDEW (lower) solutions at different temperatures (°C).

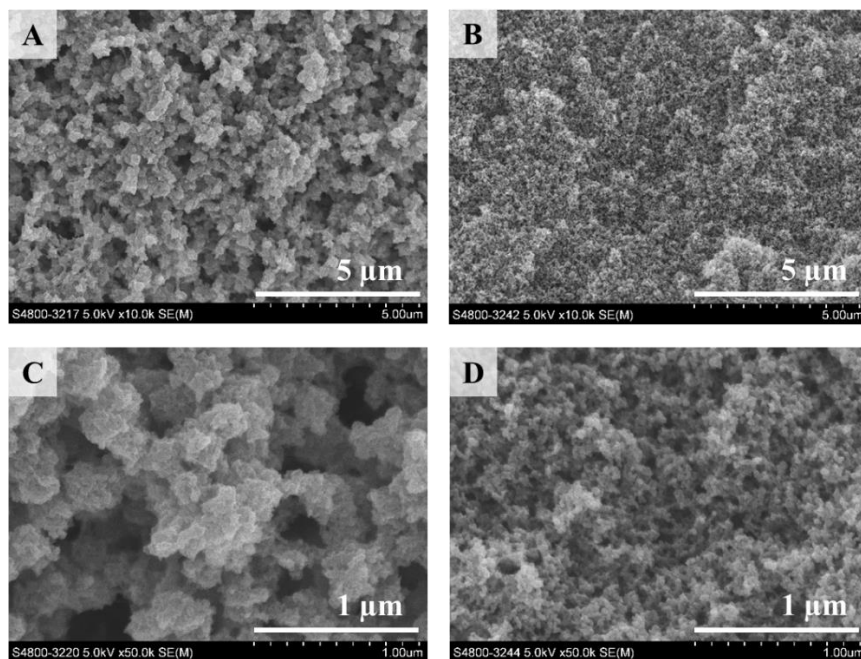


Fig. 19 Scanning electron microscope images of NDEW (A, C) and HDEW (B, D) gels. A and B are at 10 000× magnification; C and D are at 50 000× magnification. The white line represents the scale.

2.3 平均粒径の熱変化挙動

各温度で加熱処理したタンパク質濃度 0.1% の希薄濃度系にて DEW 溶液のタンパク質粒子半径を求めた (Fig. 20)。未加熱では、NDEW に比べて、HDEW タンパク質の平均粒子半径が小さかった。NDEW を水溶液中で加熱すると、60°C で粒子半径が急に増加したが、70°C 以上では加熱温度の上昇に従い粒子半径はわずかに減少する傾向が認められた。一方、HDEW 溶液においては加熱しても平均粒子半径の増大は認められなかった。したがって、HDEW タンパク質は希薄溶液中で会合しにくく、加熱による凝集も抑制されると認められた。

また、未加熱の HDEW の平均粒子半径は 22.2 nm であり、前述した SEM で観察した加熱ゲルの構成ユニット半径(18.2 nm)とそのサイズはおおむね一致した。

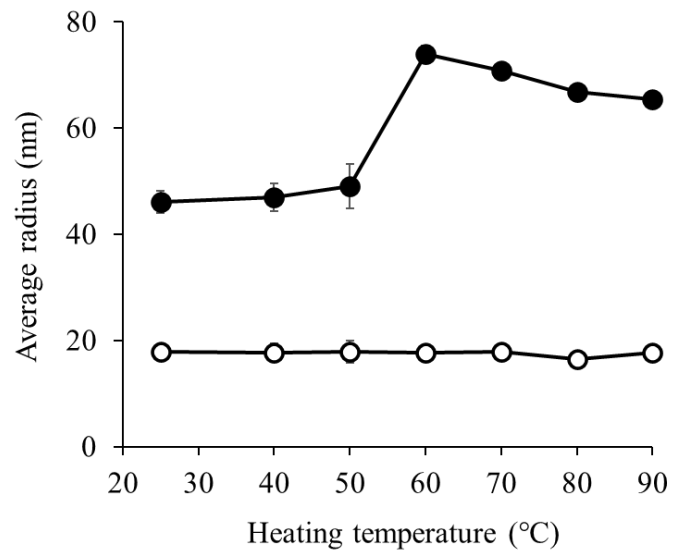


Fig. 20 Thermally induced changes in mean particle size of NDEW (filled circles) and HDEW (open circles) proteins.

2.4 加熱ゲル化におけるタンパク質の凝集挙動解析

各温度で溶液加熱した乾燥卵白を電気泳動により分析した (Fig. 21 A-F)。

BN-PAGE の結果、NDEW では 25°C (未加熱)において、OVA および OVT のバンドが認められ、加熱試料ではそれぞれ 60°C および 75°C にてバンド強度の急激な減衰が認められた (Fig. 21 A, B)。HDEW では未加熱において、NDEW と比較してブロードな OVA のバンド、移動度が大きい OVT のバンド、および 146 kDa 以上の領域に可溶性凝集体のブロードなバンドが認められたことより、可溶性凝集体は分子量分布が広く、卵白タンパク質の重合度に幅があることが明らかになった。加熱試料における各バンドはいずれも急激な減衰は認められず、OVA および OVT は NDEW のそれらよりも低い温度からバンド強度が徐々に減衰した。可溶性凝集体のバンドは徐々に高分子シフトし、60°C 以上では消失した。さらに、HDEW では OVA の減衰温度が顕著に低かった。以上より、HDEW タンパク質において非共有結合または共有結合を介した凝集は NDEW よりも低温から生じ、加熱温度の上昇に伴い徐々に進行することが明らかになった。

非還元 SDS-PAGE の結果、NDEW では未加熱において、OVA、OVT および LYZ の明瞭なバンドが認められた (Fig. 21 C, D)。NDEW の加熱試料において、OVT、LYZ および OVA のバンドはそれぞれ 60°C、65°C および 75°C にてその大半が急激に減衰した。OVA バンドの減衰に伴い、80 kDa 以上の領域にスメアバンドの出現が認められた。HDEW では未加熱において、NDEW と比較してバンド強度の低い OVT、強度および形状ともに同等の LYZ、移動度が等しいバンドおよび大きいバンドに分割された OVA が認められた。さらに、10 kDa 以下の領域にも NDEW にはないバンドが認められた。HDEW の加熱試料のバンドは、BN-PAGE と同様に減衰挙動が緩やかであった。OVT は減衰温度が 5°C 低下した。OVA は移動度の高いバンドの方がより高温においても残存した。10 kDa 以下のバンドについても徐々に減衰する傾向が認められた。また、可溶性凝集体も加熱温度の上昇に伴い徐々にバンド強度が減衰した。

還元 SDS-PAGE の結果、未加熱において、NDEW では OVA、OVT および LYZ の明瞭なバンドが認められ、HDEW においては OVA のバンドは 30~40 kDa の領域にて認められた (Fig. 21 E, F)。また、HDEW においては 10 kDa 以下のバンドの強度が非還元条件よりも増加した。加熱試料のバンド強度は NDEW および HDEW とともにそれぞれの未加熱と比較して顕著な変化は認められなかった。以上の結果より、タンパク質の凝集は還元処理すると認められず、pH 7.0 における加熱ゲル化時には LAN 結合の寄与は小さいことが明らかとなった。さらに、HDEW タンパク質が加熱温度の上昇に伴い徐々に凝集する現象には SS 結合や疎水結合が寄与することを明らかとした。

また、OVA が SS 結合を形成した 75°C以上の各電気泳動によるバンド強度を比較すると、BN-PAGE および還元 SDS-PAGE では顕著な差異は認められなかった。非還元 SDS-PAGE において NDEW では単量体 OVA および高分子領域のバンドが認められたが、その一方で HDEW ではそれらの強度は NDEW よりも小さかった。したがって、HDEW タンパク質は NDEW タンパク質よりも分子間 SS 結合を形成するタンパク質の割合が大きいことが明らかになった。

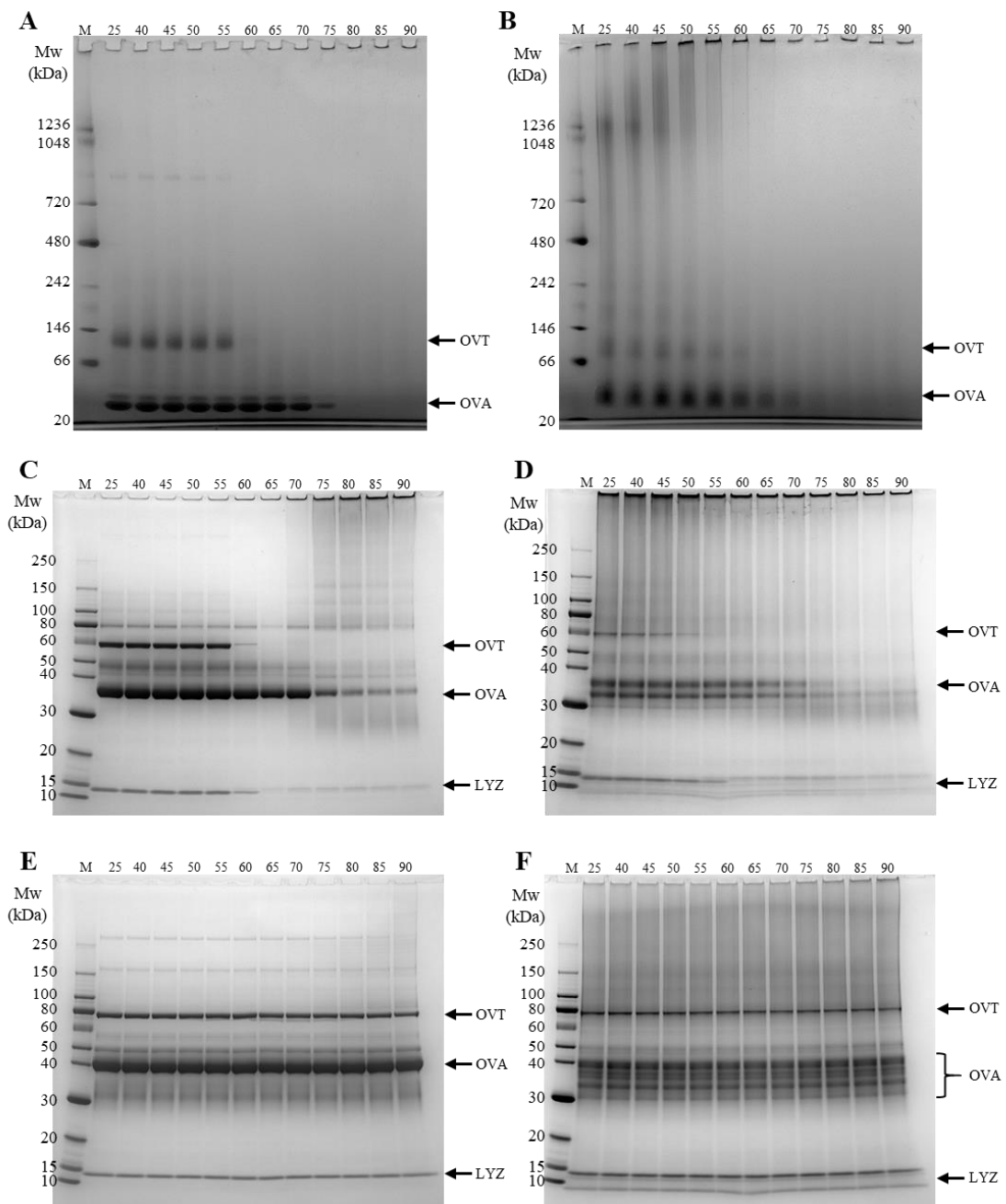


Fig. 21 PAGE analysis of NDEW (A, C, E) and HDEW (B, D, F) solutions heated at different heating temperatures. A, B: Blue-Native PAGE; C, D: non-reducing SDS-PAGE; E, F: reducing SDS-PAGE. The numbers above the graph indicate the heating temperature (°C). M, molecular weight marker. OVT, OVA, and LYZ show ovotransferrin, ovalbumin, and lysozyme, respectively.

2.5 タンパク質三次構造の熱変性挙動

DEW 溶液を加熱し、タンパク質の表面疎水性を測定した (Fig. 22 A)。未加熱の試料では NDEW と比較して HDEW の方が表面疎水性は高値を示した。加熱した試料において、タンパク質分子の表面疎水性は NDEW では 50°C から増加し、HDEW では NDEW よりも低い温度から増加が認められ、両者は 80°C 以上で同程度の数値を示した。未加熱と 90°C 加熱で比較すると、表面疎水性の増加率は NDEW よりも HDEW で小さかった。

DEW 溶液を加熱しゼータ電位を測定した (Fig. 22 B)。未加熱の試料において、NDEW と比較して HDEW においてゼータ電位は 3.0 倍増加し、乾熱処理による表面負電荷の増加が認められた。加熱試料において、NDEW では 50°C 以上で表面負電荷が増加し、加熱温度の上昇に従い増加傾向が認められた。一方で、HDEW では加熱による表面電荷の顕著な変化は認められなかった。70°C 以上において、両者のゼータ電位は概ね一致した。

2.6 分子橢円率の熱変性挙動

未加熱および 80°C にて加熱処理した試料タンパク質の CD を測定し、分子橢円率を算出した (Fig. 23)。未加熱の試料について、NDEW のスペクトルにて 208、222 nm に負のピークが認められた。一方、HDEW のスペクトルは NDEW と比較して絶対値が小さく、214 nm 付近に負のピークが認められた。80°C にて加熱した試料は、NDEW においてスペクトルの絶対値は未加熱の HDEW と同等であった。一方、HDEW の加熱試料においてはスペクトルの絶対値は減少したが、その減少率は NDEW と比較して小さく、214 nm 付近のピークは維持された。なお、80°C 加熱試料については、両者ともに 208 nm のピークが認められたが、222 nm にはピークは認められなかった。

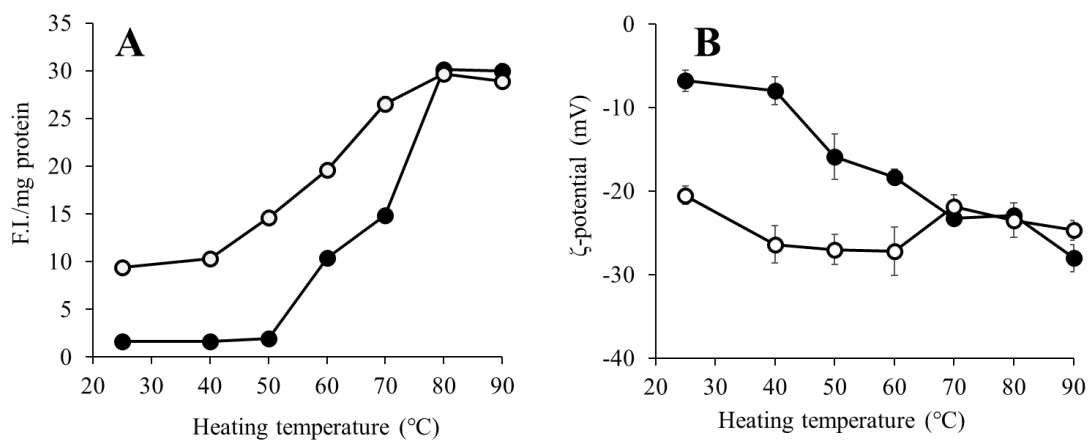


Fig. 22 Thermally induced changes in surface hydrophobicity (A) and zeta potential (B) of NDEW (filled circles) and HDEW (open circles) proteins.

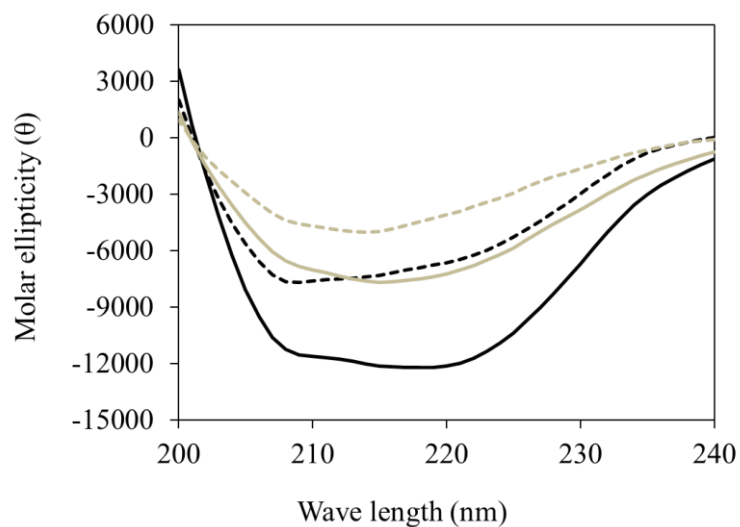


Fig. 23 Molar ellipticity of unheated (solid line) and heated at 80°C (dotted line) for NDEW (black line) and HDEW (gray line) solutions.

2.7 SH 基および共有結合の定量

乾燥卵白タンパク質の遊離 SH 基を定量した (Table 5)。HDEW は NDEW と比較して遊離 SH 基量は有意に少なく、全 SH 基量(遊離および SS 結合を形成するシステイン残基量)についても少ない傾向が認められた。LAN および LAL 結合の形成量は NDEW と比較して HDEW において有意に多く、中でも LAL 結合の形成量は LAL 結合の 3.5 倍と顕著に多かった。

2.8 陰イオン交換 HPLC

DEW 溶液を陰イオン交換 HPLC にて分析した (Fig. 24)。NDEW においては、保持時間 (RT) 9.2 min および 11.0 min に主要なピークが認められた。一方、HDEW においては、NDEW と同様のピークは認められず、保持時間が全体的に遅延し、RT 12.8 min に最大値をもつブロードなピーク認められた。以上の結果を踏まえて、RT 9.0~14.5 min の範囲で 30 sec 毎に溶離液を分取し、BN-PAGE に供した(Fig. 25)。その結果、NDEW において、OVT、OVA の順に溶出が認められ、画分 9 以降にバンドは認められなかった。HDEW においては、OVA、可溶性凝集体の順に溶出が認められた。NDEW については 9.2 min および 11.0 min のピークの主成分はそれぞれ OVT および OVA で、HDEW については、RT の早い成分は OVA、RT の遅い成分は可溶性凝集体であることが示された。HDEW においては溶出時間に伴い、OVA のバンドは移動度が高い傾向が、可溶性凝集体は移動度が小さい傾向が認められた。なお、OVA は画分 5~8 を中心に認められ、溶出時間は両試料間で概ね一致した。さらに、可溶性凝集体は RT の遅い成分ほど分子量が大きくなる傾向が認められた。以上の結果より、両試料間の OVA の表面負電荷は同等であるが、HDEW の可溶性凝集体は NDEW タンパク質よりも強い表面負電荷をもつことが示された。

Table 5 Number of thiol groups and isopeptide bonds

	NDEW	HDEW
Free SH	57.8 ± 1.0	51.1 ± 0.7 **
Total SH	190.0 ± 9.7	181.4 ± 5.7
LAN	0.23 ± 0.02	1.11 ± 0.12 **
LAL	0.17 ± 0.04	3.90 ± 0.67 **

LAN, lanthionine; LAL, lysinoalanine; SH, thiol groups. * and ** mean statistically significant difference at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

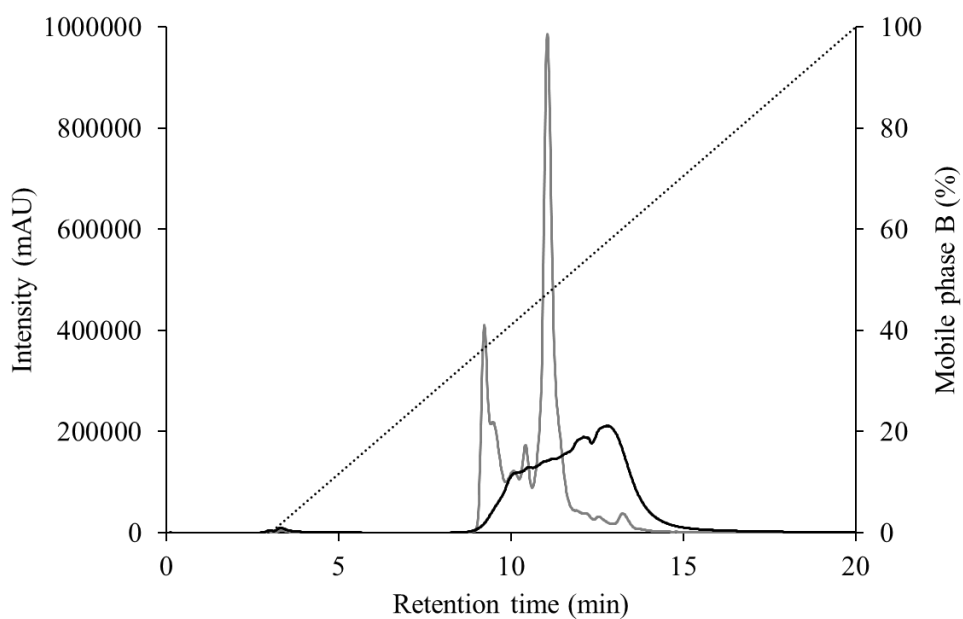


Fig. 24 Anion exchange chromatogram of NDEW (gray solid line) and HDEW (black solid line) proteins. Dotted line represents gradient conditions (Mobile phase B (%)).

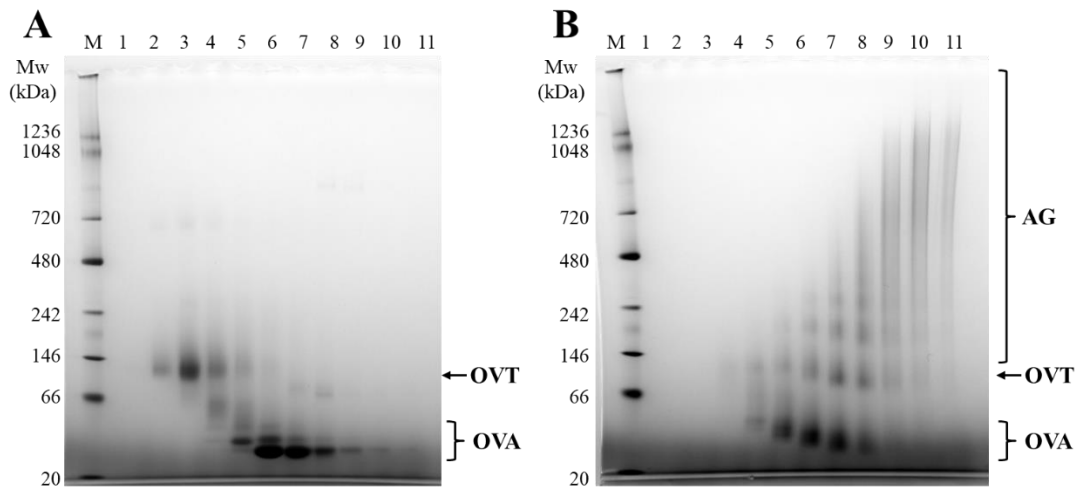


Fig. 25 Blue-native PAGE analysis of the fractions separated by anion exchange chromatography. M, Molecular weight marker; A, NDEW; B, HDEW. OVT, OVA, and AG show ovotransferrin, ovalbumin, and soluble aggregates, respectively.

2.9 分解タンパク質の同定

Tricine SDS-PAGE により両試料を分析した (Fig. 26)。その結果、HDEW において、OVA および LYZ よりも移動度の高いバンドが認められた。以下、OVA よりも移動度の高いバンドをフラグメント A、LYZ よりも移動度の高いバンドをフラグメント B とした。両フラグメントにて分子量を求めた結果、フラグメント A およびフラグメント B はそれぞれ約 40 kDa および 5.8 kDa であると認められた。HDEW においては、凝集体のバンドや OVA よりもやや低分子量の位置に OVM が存在するため、OVT や OVA に加えてフラグメント A についてもバンド強度にて含有量を推定するのは困難と判断した。それゆえ、妨害バンドが認められない LYZ よりも低分子領域のバンドのみ算出した。その結果、HDEW の LYZ の強度を 100 % とすると、フラグメント B の強度は 125.2 % であった。

Tricine SDS-PAGE のゲルより、両フラグメントのバンドを切り出し、トリプシン処理し、LC-Q-TOF にて分析後、Mascot にて解析し、由来タンパク質の同定を行った。その結果、検出されたペプチド配列より、フラグメント A は 2 種類、フラグメント B は 6 種類のタンパク質がヒットした。両フラグメントとも、OVA (遺伝子名: OVAL_CHICK) の検出ペプチド数およびスコアが最も高かった (Table 6)。それぞれの OVA の分子量は 45 kDa と報告されていることから、両フラグメントの合計の分子量とも矛盾は認められなかった。そこで、検出されたペプチドのうち OVA 由来のペプチド配列を抽出し、OVA (OVAL_CHICK) のアミノ酸配列上のどの位置に相当するか検討した (Table 7, Fig. 27)。フラグメント A では 12 か所の配列が検出され、OVA の C 末端側の大部分に相当した。また、フラグメント B では 2 か所の配列が検出され、OVA の N 末端側の約 50 残基に相当した。

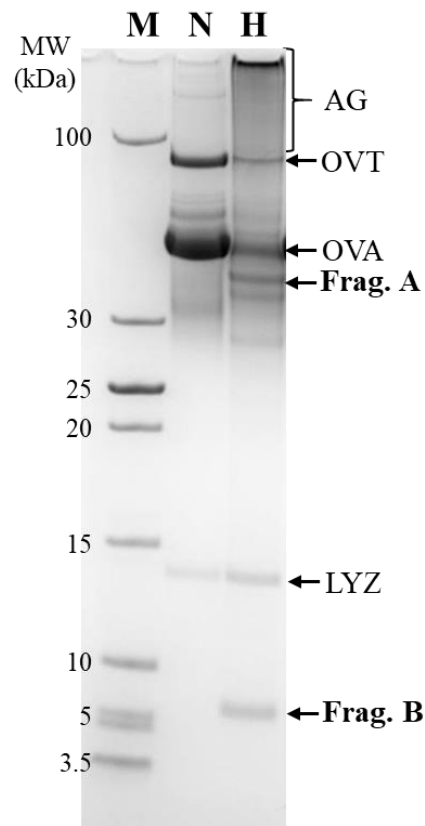


Fig. 26 Tricine SDS-PAGE analysis of the DEW proteins. M, Molecular weight marker; N, NDEW; H, HDEW. OVT, OVA, LYZ and AG show ovotransferrin, ovalbumin, lysozyme and soluble aggregates, respectively.

Table 6 Matched proteins by the Mascot analysis.

Samples No.	Accession	Score	Mass	Matches	Sequences	emPAI
Frag. A	1 OVAL_CHICK	683	43196	58	12	6.5
	2 A0A1D5PIL7_CHICK	44	43934	1	1	0.1
Frag. B	1 OVAL_CHICK	199	43196	11	2	0.46
	2 A0A1D5NYL1_CHICK	46	71682	1	1	0.06
	3 A0A1D5PQA3_CHICK	39	161196	1	1	0.03
	4 A0A1D5PIL7_CHICK	39	43934	1	1	0.1
	5 A0A1D5NTK4_CHICK	37	149670	1	1	0.03
	6 A0A1D5PEF7_CHICK	33	156565	1	1	0.03

Table 7 Matched sequences for OVA

	Start	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Score	Peptide
A	86–105	761.0709	2280.191	2281.159	0.9682	37	R.DILNQITKPNDEVYFSLASR.L + Deamidated (NQ)
A	86–105	761.0709	2280.191	2281.159	-0.9682	40	R.DILNQITKPNDEVYFSLASR.L + Deamidated (NQ)
A	86–105	761.3955	2281.165	2281.159	0.0056	39	R.DILNQITKPNDEVYFSLASR.L + Deamidated (NQ)
A	86–105	761.3955	2281.165	2281.159	0.0056	27	R.DILNQITKPNDEVYFSLASR.L + Deamidated (NQ)
A	86–105	761.3955	2281.165	2282.143	-0.9784	59	R.DILNQITKPNDEVYFSLASR.L + 2 Deamidated (NQ)
A	112–123	761.9042	1521.794	1521.79	0.0037	33	R.YPILPEYLQCVK.E
A	128–143	844.4241	1686.834	1686.833	0.0011	47	R.GGLEPINFQTAADQAR.E
A	128–143	844.4241	1686.834	1686.833	0.0011	33	R.GGLEPINFQTAADQAR.E
A	128–143	844.4241	1686.834	1686.833	0.0011	55	R.GGLEPINFQTAADQAR.E
A	128–143	844.4241	1686.834	1686.833	0.0011	83	R.GGLEPINFQTAADQAR.E
A	128–143	844.4241	1686.834	1686.833	0.0011	42	R.GGLEPINFQTAADQAR.E
A	128–143	563.2877	1686.841	1686.833	0.0086	34	R.GGLEPINFQTAADQAR.E
A	128–143	563.2877	1686.841	1686.833	0.0086	28	R.GGLEPINFQTAADQAR.E
A	128–143	563.2877	1686.841	1686.833	0.0086	37	R.GGLEPINFQTAADQAR.E
A	128–143	563.2877	1686.841	1686.833	0.0086	29	R.GGLEPINFQTAADQAR.E
A	128–143	563.2877	1686.841	1687.817	-0.9754	28	R.GGLEPINFQTAADQAR.E + Deamidated (NQ)
A	144–159	929.9722	1857.93	1857.959	-0.0287	46	R.ELINSWVESQTNGIIR.N
A	144–159	929.9879	1857.961	1857.959	0.0027	46	R.ELINSWVESQTNGIIR.N
A	144–159	929.9879	1857.961	1857.959	0.0027	36	R.ELINSWVESQTNGIIR.N
A	144–159	620.3305	1857.97	1857.959	0.0112	55	R.ELINSWVESQTNGIIR.N
A	144–159	620.6586	1858.954	1858.943	0.0116	39	R.ELINSWVESQTNGIIR.N + Deamidated (NQ)
A	144–159	620.6586	1858.954	1858.943	0.0116	34	R.ELINSWVESQTNGIIR.N + Deamidated (NQ)
A	144–159	930.4777	1858.941	1859.927	-0.9857	46	R.ELINSWVESQTNGIIR.N + 2 Deamidated (NQ)
A	144–159	930.4777	1858.941	1859.927	-0.9857	74	R.ELINSWVESQTNGIIR.N + 2 Deamidated (NQ)
A	160–182	820.78	2459.318	2459.309	0.0086	30	R.NVLQPSSVDSQTAMVLVNAIVFK.G
A	160–182	820.78	2459.318	2459.309	0.0086	39	R.NVLQPSSVDSQTAMVLVNAIVFK.G
A	160–182	820.78	2459.318	2459.309	0.0086	31	R.NVLQPSSVDSQTAMVLVNAIVFK.G
A	160–182	820.78	2459.318	2459.309	0.0086	33	R.NVLQPSSVDSQTAMVLVNAIVFK.G
A	160–182	820.78	2459.318	2459.309	0.0086	53	R.NVLQPSSVDSQTAMVLVNAIVFK.G
A	160–182	820.78	2459.318	2460.293	-0.9754	47	R.NVLQPSSVDSQTAMVLVNAIVFK.G + Deamidated (NQ)
A	160–182	820.78	2459.318	2460.293	-0.9754	40	R.NVLQPSSVDSQTAMVLVNAIVFK.G + Deamidated (NQ)

	Start	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Score	Peptide
A	160–182	820.78	2459.318	2460.293	-0.9754	32	R.NVLQPSSVDSQTAMVLVNAIVFK.G + Deamidated (NQ)
A	191–200	605.2671	1208.52	1208.513	0.0064	27	K.DEDTQAMPFR.V
A	191–200	605.2671	1208.52	1208.513	0.0064	37	K.DEDTQAMPFR.V
A	191–200	605.2671	1208.52	1208.513	0.0064	39	K.DEDTQAMPFR.V
A	191–200	605.2671	1208.52	1208.513	0.0064	39	K.DEDTQAMPFR.V
A	220–227	411.7068	821.399	821.3953	0.0038	21	R.VASMASEK.M
A	220–227	411.7068	821.399	821.3953	0.0038	23	R.VASMASEK.M
A	230–264	1288.338	3861.993	3862.004	-0.0105	34	K.ILELPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIIINFEK.L
A	230–264	1288.338	3861.993	3862.004	-0.0105	46	K.ILELPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIIINFEK.L
A	230–264	1288.338	3861.993	3862.004	-0.0105	55	K.ILELPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIIINFEK.L
A	230–264	1288.338	3861.993	3862.004	-0.0105	53	K.ILELPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIIINFEK.L
A	230–264	1288.338	3861.993	3862.988	-0.9945	33	K.ILELPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIIINFEK.L + Deamidated (NQ)
A	265–277	791.3666	1580.719	1580.714	0.0046	39	K.LTEWTSSNVMEER.K
A	265–277	791.3666	1580.719	1580.714	0.0046	36	K.LTEWTSSNVMEER.K
A	265–277	791.3666	1580.719	1580.714	0.0046	28	K.LTEWTSSNVMEER.K
A	265–277	791.3666	1580.719	1581.698	-0.9794	46	K.LTEWTSSNVMEER.K + Deamidated (NQ)
A	265–277	791.3666	1580.719	1581.698	-0.9794	55	K.LTEWTSSNVMEER.K + Deamidated (NQ)
A	324–340	591.9744	1772.901	1772.892	0.0097	24	K.ISQAVHAAHAEINEAGRE
A	324–340	591.9744	1772.901	1772.892	0.0097	45	K.ISQAVHAAHAEINEAGRE
A	324–340	591.9744	1772.901	1772.892	0.0097	26	K.ISQAVHAAHAEINEAGRE
A	324–340	591.9744	1772.901	1773.876	-0.9743	31	K.ISQAVHAAHAEINEAGRE + Deamidated (NQ)
A	341–360	670.3228	2007.947	2007.939	0.008	27	R.EVVGSAEAGVDAASVSEEFR.A
A	371–382	673.3746	1344.735	1344.73	0.0045	21	K.HIATNAVLFGR.C
A	371–382	673.3746	1344.735	1344.73	0.0045	36	K.HIATNAVLFGR.C
A	371–382	673.3746	1344.735	1344.73	0.0045	32	K.HIATNAVLFGR.C
A	371–382	449.2536	1344.739	1344.73	0.0088	34	K.HIATNAVLFGR.C
A	371–382	449.2536	1344.739	1344.73	0.0088	33	K.HIATNAVLFGR.C
B	2–17	904.4076	1806.801	1806.796	0.0049	43	M.GSIGAASMEFCFDVFK.E + Acetyl (Protein N-term)
B	2–17	904.4076	1806.801	1806.796	0.0049	56	M.GSIGAASMEFCFDVFK.E + Acetyl (Protein N-term)
B	2–17	904.4076	1806.801	1806.796	0.0049	49	M.GSIGAASMEFCFDVFK.E + Acetyl (Protein N-term)
B	2–17	904.4076	1806.801	1806.796	0.0049	32	M.GSIGAASMEFCFDVFK.E + Acetyl (Protein N-term)
B	2–17	904.4076	1806.801	1806.796	0.0049	72	M.GSIGAASMEFCFDVFK.E + Acetyl (Protein N-term)
B	2–17	904.4076	1806.801	1806.796	0.0049	48	M.GSIGAASMEFCFDVFK.E + Acetyl (Protein N-term)

	Start	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Score	Peptide
B	2-17	912.4048	1822.795	1822.791	0.0045	32	M.GSIGAASMEFCFDVFK.E + Acetyl (Protein N-term); Oxidation (M)
B	21-47	759.1364	3032.516	3032.507	0.0089	18	K.VHHANENIFYCPIAIMSALAMVYLGA.K.D
B	21-47	759.1364	3032.516	3032.507	0.0089	22	K.VHHANENIFYCPIAIMSALAMVYLGA.K.D
B	21-47	759.1498	3032.57	3032.507	0.0628	35	K.VHHANENIFYCPIAIMSALAMVYLGA.K.D
B	21-47	759.1364	3032.516	3033.491	-0.9751	23	K.VHHANENIFYCPIAIMSALAMVYLGA.K.D + Deamidated (NQ)

The letters A and B represent Fragment A and Fragment B.

```

          10          20          30          40          50
MGSIGASME FCFDVFKE LK VHHANENIFY CPIAIMSALA MVYLGA KDST
          60          70          80          90          100
RTQINKVVR FDKLPGFGDSI EAQCGTSVNV HSSLRDI LNQ ITPNDVYSE
          110         120         130         140         150
SLASRLYAE E RYPILPEYLO CVKELYR GGL EPINFQTAAD QARELINSWV
          160         170         180         190         200
ESQTNGIIR N VLQPSSVDSQ TAMVLVNAI V FKGLWEKAFK DEDTQAMPFR
          210         220         230         240         250
VTEQESKPV Q MMYQIGLFRV ASMASEKMKI LELPFASGTM SMLVLLPDEV
          260         270         280         290         300
SGLEQLESII NFEKLTEWTS SNVMEERKIK VYLPRMKMEE KYNLTSVLMA
          310         320         330         340         350
MGITDVFSSS ANLSGISSAE SLKISQAVHA AHAEINEAGR EVVGSAEAGV
          360         370         380         386
DAASVSEEFR ADHPFLFCIK HIATNAVLFF GRCVSP

```

Fig. 27 The amino acid sequences of ovalbumin (SERPINB14). The thick and thin gray marker show fragment A and fragment B obtained from HDEW.

3. 考察

3.1 乾熱処理が DEW 溶液の加熱挙動に及ぼす影響

本研究では、DEW が乾熱処理により高硬度ゲル形成能を獲得する要因の解明に取り組んだ。液卵白を脱糖および噴霧乾燥した NDEW およびこれを乾熱処理した HDEW を試料とした。HDEW の水溶液を 80°C にて加熱し調製したゲルは NDEW と比較して 4.9 倍硬く、先行研究と一致した傾向を示したことより、試験対象として適切な試料であると判断した(Handa *et al.*, 2001; Mine, 1996)。

まず、ゲルネットワークおよびタンパク質の凝集性について比較した。80°C にて調製したゲルは NDEW では構成単位が大きく疎な構造を有するランダム凝集モデルに相当するネットワークが、HDEW では構成単位が小さく緻密な構造を有する数珠玉モデル様のネットワークが認められた。さらに希薄溶液において、HDEW は未加熱で NDEW と比較して粒子径が小さく、加熱による粒子径の増加も認められなかった。さらに、HDEW では未加熱溶液のタンパク質粒子半径とゲル構成単位の粒子半径は概ね一致した。以上の結果は、Kato らが希薄溶液を用いた試験で提唱した、HDEW タンパク質は凝集しにくい性質を有し、ゲル形成時の凝集が抑制されること、および可溶性凝集体がゲル構成単位として振る舞うと推察した仮説を支持した (Kato *et al.*, 1990a)。次に、HDEW タンパク質の凝集抑制に寄与する要因について検討した。タンパク質濃度 10 % (w/w) 溶液の加熱ゲル化温度を検討した結果、HDEW は NDEW よりも 15°C 低い 60°C でゲルを形成し、70°C 以上の加熱により形成された HDEW ゲルは 90°C 加熱で調製された NDEW ゲルよりも硬かった。また、ゲル形成温度を測定した試料の加熱温度の上昇に伴う状態変化を観察すると、NDEW では 60°C にて急に強い白濁が認められたが、HDEW では明瞭な変曲点は認められず、透明度が高かった。NDEW と比較して HDEW ゲルのネットワークは数珠玉モデル様であるため、光の散乱が抑制され、透明度が増したと考えられた。これらの結果より、ゲル形成に伴うタンパク質の凝集温度が低下し、変化が緩やかになったと推察された。そこで電気泳動にてゲル化時のタンパク質の凝集挙動を解析した。NDEW では、各タンパク質は加熱温度が増加すると、ある温度で非共有結合および SS 結合を伴い凝集するが、90°C で加熱しても一部の OVA は SS 結合により重合しなかった。一方、HDEW では、タンパク質の大半を占める OVA および可溶性凝集体は加熱温度の上昇に伴い緩やかに凝集が進行し、大半のタンパク質は 75°C 以上で SS 結合を伴い凝集した。以上の結果より、NDEW と比較して HDEW ではゲル形成時にタンパク質分子間に効率よく SS 結合が導入されていることが明らかとなった。通常、ゲルを調製する際は目的温度への達温までに低温からの昇

温過程を経るため、ゲルは緩やかな昇温過程で形成される。すなわち、タンパク質の変性および凝集温度が一定の場合は、凝集が一度に生じるが、広範な場合は凝集温度が低いタンパク質から段階的に凝集が進行するものと推定された。それゆえ、NDEW にみられる通常のタンパク質は一定の温度に達すると一度に大量のタンパク質が変性して凝集が生じるため、ランダムな凝集により大きな構成単位を形成すると推察された。その一方で、HDEW タンパク質においては変性温度が低下し広範になり、凝集が段階化すると推察され、1 分子当たり凝集するタンパク質分子数の制限や数珠玉モデル様の規則正しい凝集に寄与することが示唆された。なお可溶性凝集体は加熱によりバンドが消失したモノマータンパク質と比較して、徐々に分子サイズが増加することが認められた。ゲルを形成できるタンパク質高濃度条件においては、タンパク質の分子間距離が近く、凝集体のサイズが大きくなりやすいと考えられることから、可溶性凝集体は他のタンパク質よりも反応性が高い官能基の露出および凝集が強く制限されるものと考えられた。

そこで次に、タンパク質の熱変性に伴う構造変化に着目した。卵白タンパク質の熱変性に伴い、三次構造では表面疎水性および表面電荷の増加が、二次構造については α -ヘリックスの崩壊が生じるとされる。タンパク質三次構造の加熱変化挙動について、表面疎水性は NDEW と比較して、HDEW では乾熱処理により未加熱において高い水準であり、加熱により低い温度から増加が認められたが、加熱による増加率は緩やかであった。表面疎水性とゲル形成温度、凝集挙動はよく似た傾向を示した。HDEW タンパク質は乾熱処理による部分変性を受けた影響により、未加熱において NDEW よりも表面負電荷が強く、加熱による顕著な増減は認められなかった。また、タンパク質の二次構造は、乾熱処理により減少するが、液中での加熱による変化率は NDEW よりも HDEW にて小さかった。以上の結果より、HDEW タンパク質は乾熱処理により部分変性し、一部の疎水領域および大半の荷電性残基を露出した構造をなし、ゲル形成時の加熱による構造変化が抑制されることを明らかにした。HDEW は疎水領域が露出した状態であるため、タンパク質に分子間結合が生じやすく反応性が高いものと考えられる。また、加熱による表面疎水性の変化は緩やかであり、ゲルの濁度変化が小さく、分子間凝集が徐々に進行したこととの関連性が認められた。一方で、加熱温度が低くとも負電荷が高い水準であるため、何れの温度帯でも分子間斥力が強く、ゲル形成時に分子間結合可能な部位を限定するものと推察された。なお、Ogawa ら (2003) は凍結乾燥後乾熱処理した卵白および OVA の水溶液よりゲルを調製する際、静電遮蔽効果を持つ NaCl を添加すると、ゲルの硬度変化に一定の傾向は認められないと報告している。したがって、静電反発力のみではゲル高硬度が生じる

要因を説明しきれないと考えた。

3.2 可溶性凝集体および部分分解タンパク質の性状解析

可溶性凝集体のバンドは、BN-PAGE および非還元 SDS-PAGE 非還元 SDS-PAGE においても認められ、還元 SDS-PAGE においては低分子化するものの残存した。したがって、可溶性凝集体の形成には、SS 結合およびその他の共有結合が寄与するものと考えられた。HDEW において、遊離 SH 基および全 SH 基の減少が認められた一方で、LAN および LAL 結合の形成が認められた。LAN および LAL 結合は HDEW にて生成が顕著に認められ、LAL 結合の方が生成量は多かった。この結果は、液卵白の加熱ゲル化時に LAN 結合の方が優位に生成したことは異なる挙動を示した。さらに、他の先行研究においてもタンパク質溶液の加熱処理により、LAN 結合の方が LAL 結合よりも優位に生成することが報告されている (Hasegawa & Iwata, 1982; Rombouts *et al.*, 2016)。LAN および LAL の形成性は乾熱処理と加熱ゲル化においては異なる挙動を示すことが示唆された。その要因として、水分含量の差異が考えられた。加熱ゲル化は溶液中の反応であるため、中性～アルカリ性において、タンパク質のリジン残基の ϵ -アミノ基へのプロトン付加が促進されマイケル付加が生じにくくなるが、その一方で乾熱処理時には、タンパク質は微水分下であるため、リジン残基の ϵ -アミノ基が生に帯電しにくく、マイケル付加しやすい状態にあると推定される。したがって、乾熱処理時には LAL の生成量が増えたと推察された。以上より、HDEW において LAL 結合は可溶性凝集体の形成に大いに寄与することが認められた。LAL 結合は還元非可逆的で、加熱による架け換えも生じないと推定される。以上より、LAL 結合は凝集体の分子構造を拘束し、タンパク質の加熱による構造変化を抑制することで、タンパク質の二次及び三次構造の変化を抑制したと推察された。LAN 結合、LAL 結合および SS 結合のほかに、タンパク質の分子間に形成される共有結合として、トランスグルタミナーゼによりタンパク質のグルタミン残基とリジンの ϵ -アミノ基の架橋により形成される ϵ -(γ -グルタミル)リジン結合がある (Kornguth & Waelsch, 1963)。TG を卵白に作用させて 0.2 $\mu\text{mol/g}$ の GL 結合を形成してから調製した加熱ゲルの硬度は、未処理と比較して約 2 倍に増加することが報告されている (Sakamoto, Kumazawa, & Motoki, 1994)。この試験は、卵白タンパク質に ϵ -(γ -グルタミル)リジン結合を形成後、加熱ゲルを調製している点で、乾熱処理により卵白タンパク質に LAL を形成後、加熱ゲルを調製する本試験と構成が一致している。したがって、LAL 結合もゲル高硬度化に寄与する可能性も示唆された。

表面負電荷の強い HDEW の中でも、可溶性凝集体の表面負電荷が極めて強

く分子サイズと正の相関が認められた。負に帯電した分子がポリマーを形成することにより、その分子数に比例して負電荷が増加すると考えられるため、この結果は妥当であると考えられた。一方、モノマーOVA の表面負電荷はNDEW と概ね同等であったことから、モノマーOVA が乾熱処理により受けた変性は限定的であると推察された。この結果は、乾熱処理により構造変化を伴い変性したタンパク質は主に可溶性凝集体を形成することを示唆した。すなわち、乾熱処理によるタンパク質に生じた変化の大半は可溶性凝集体に由来するものと示唆された。以上の結果より、可溶性凝集が他のタンパク質よりも凝集が強く抑制される要因として、LAL 結合による構造変化の抑制および強い表面負電荷による静電反発力が寄与するものと示唆された。

Tricine SDS-PAGE にて、OVA および LYZ よりも移動度の大きい位置にそれぞれフラグメント A およびフラグメント B が HDEW のみに認められた。質量分析の結果、両フラグメントはいずれも OVA の部分構造であることが明らかとなり、フラグメント B は OVA の N 末端側の約 5.8 kDa を含有し、フラグメント A は C 末端側の約 40 kDa の領域を含むことを明らかにした。タンパク質の分解による機能改変については、一般に酵素処理が利用されている。しかし、本研究で認められたタンパク質主鎖の切断は、乾熱処理において認められたことから非酵素的な化学反応であると推察された。また、水溶液中の反応ではあるものの、タンパク質やペプチドのグルタミン酸、アスパラギン酸、グルタミンおよびアスパラギンは一定の割合で非酵素的な加水分解が生じるとの報告もある (Catak *et al.*, 2008; Stephenson & Clarke, 1989)。したがって、各フラグメントの分子量を考慮すると、グルタミン酸 (48 番目)、アスパラギン (53 番目)、またはグルタミン (55 番目)のいずれかが切断部位であると推察された。次に、OVA の切断がゲル形成に与える影響について検討した。OVA (SerpinB14) のアミノ酸配列を用いて Kyte & Doolittle (1982) の Hydropathy plot を利用して OVA の疎水・親水領域を計算した結果、OVA には疎水領域が 7 か所あることが示された (Fig. 28)。その結果、フラグメント B に相当する N 末端側の約 50~60 残基は OVA の疎水領域 2 か所および SH 基 2 か所を有するため、反応性の高い領域であると推察された。一方、フラグメント A は OVA よりフラグメント B が欠けた状態であると認められた。これらの現象により、フラグメント A は 1 分子当たりに結合可能なタンパク数が少なくなり、巨大粒子の形成を阻害するものと推察された。一方、フラグメント B は反応性に富んだ短いタンパク質であるため、フラグメント A やその他のタンパク質の反応領域に結合可能であると考えられた。したがって、タンパク質の結合領域に結合することで、他のタンパク質同士の相互作用を拮抗的に阻害する可能性が考えられた。なお、HDEW において、フラグメント

B のバンド強度は LYZ と比較して 1.25 倍になった。HDEW における LYZ のバンド強度は NDEW と比較して高く、OVT や OVA よりも可溶性凝集体に取り込まれている割合は極めて少ないと考えられた。極端な条件ではあるが、LYZ が可溶性凝集体に取り込まれていないと仮定すると、バンド強度および分子量比からフラグメント A は LYZ の 3.1 倍個生成していると算出された。さらに、卵白において OVA 量は LYZ の 5.1 倍個である。したがって、卵白中の OVA うち 60.4% がフラグメント化していると試算された。したがって、同現象は生成量的な観点からも乾熱処理による高硬度ゲル形成に寄与するものと考えられた。ただし、先述のとおり、LYZ のみならずフラグメント A および B も自体も凝集体に取り込まれている可能性があるため、さらに詳細な検討をする必要があると考えられた。

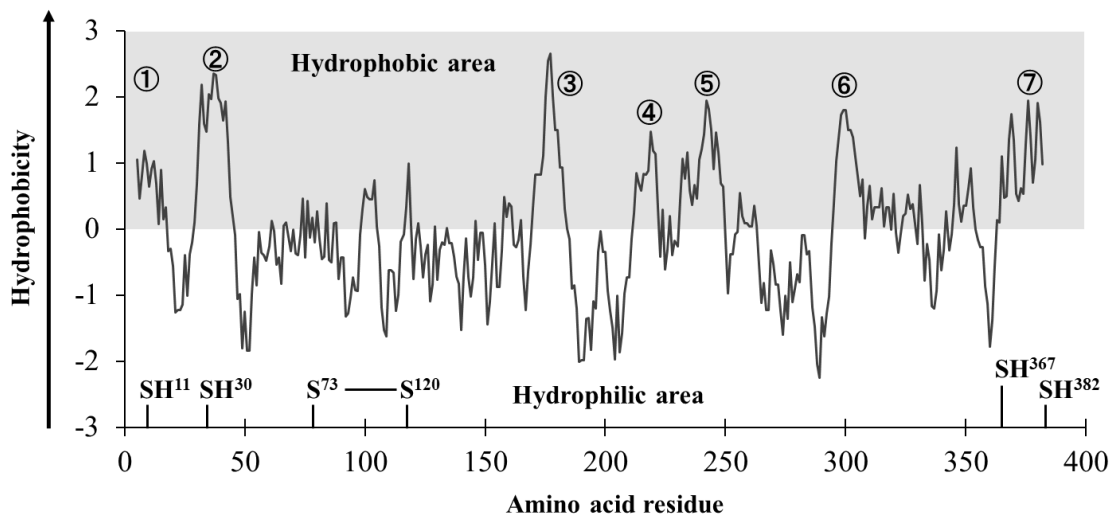


Fig. 28 Hydropathy plot of the primary structure of native ovalbumin (SERPINB14). Free sulfhydryl groups (SH) and disulfide bond (S-S) of cysteine residues in the native protein are represented with numbers that show their positions in the primary structure.

3.3 高硬度ゲル形成機構

以上の結果よりゲル高硬度化モデルを作成した (Fig. 29)。NDEW の水溶液を加熱すると、一定の温度に達した際にタンパク質が同時に変性および凝集し、大きな凝集塊を形成する。この凝集塊が重合しネットワークを形成すると、構成単位が大きく、疎なネットワークが形成されると推察された。一方、HDEW においては、乾熱処理によりタンパク質が部分変性し、LAL 結合により重合した強い負電荷をもつ可溶性凝集体の形成および OVA の部分切断が生じた。HDEW の水溶液を加熱すると、大きな凝集塊は形成されず、可溶性凝集体を構成単位とした緻密なネットワークを有する硬いゲルが形成された。ゲル形成過程において、タンパク質の凝集時に可溶性凝集体は強い負電荷が強い静電反発力を生じ結合部位を制限し、LAL 結合により分子構造の変化が制限されることで、可溶性凝集体の構造を構成単位としたゲルが形成されるものと考えられた。また切断された OVA 分子について、フラグメント A は結合領域が減少し、フラグメント B は疎水領域をブロックすることにより、結合部位が限定され、大きな凝集塊の形成抑制に寄与するものと考えられた。さらに、昇温に伴い段階的なタンパク質の凝集が認められたことより、一度に相互作用できるタンパク質分子数が制限されるため、大きな凝集塊の形成抑制に寄与するものと考えられた。また、ゲル形成におけるタンパク質分子間の結合について、HDEW において SS 結合に寄与する OVA の割合が増加したことより、分子間結合の強化が示唆され、ゲルの高硬度化に寄与するものと示唆された。Kato ら(1990a,b)は、凝集抑制および結合促進の相反する事象が乾熱処理による高硬度ゲル化に寄与するとも報告している。これを受けて本研究においては、HDEW タンパク質は加熱凝集時に静電反発力や結合領域の切断、凝集の段階化、可溶性凝集体の構造維持により結合部位は制限されるが、SS 結合形成が促進され、分子間結合力が増すことを示唆した。先行研究にて、トランスグルタミナーゼによる分子間架橋によりゲル強度が約 2 倍に増加することが報告されている (Sakamoto *et al.*, 1994)ほか、NaCl の添加濃度と乾熱処理卵白および OVA のゲル物性には一定の傾向が認められなかった (Ogawa *et al.*, 2003)。なお、本研究では NDEW と比べ HDEW でゲル硬度は 3.6 倍の増加が認められたことより、各現象の相加または相乗効果によりゲル高硬度化が生じているものと示唆された。

なお、本研究で提唱した各要因が高硬度ゲル化に与える寄与率を求めるためには、乾熱処理によって生じる各現象を切り分けて評価する必要がある。そのためには、酵素処理をはじめとする操作にて卵白タンパク質を修飾し、ゲル化性を評価する必要があると考えられた。

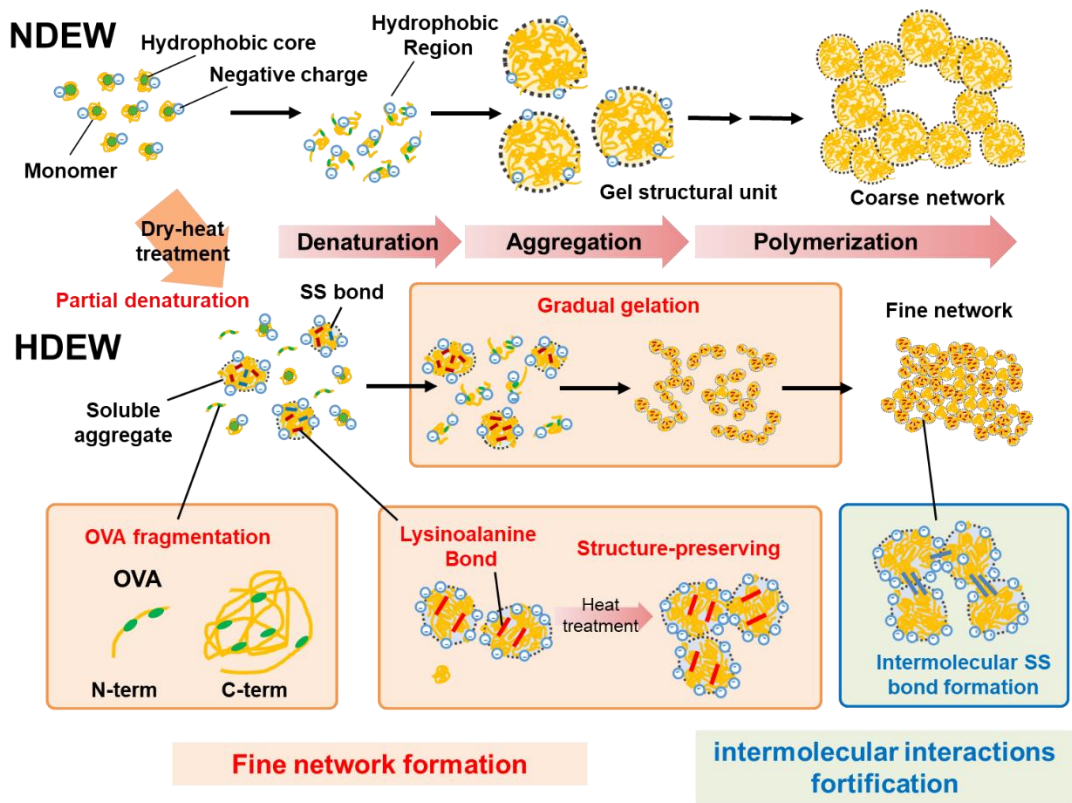


Fig. 29 Excellent gelling mechanisms of HDEW

第3章 総括

鶏卵は世界中で広く利用される食品のひとつである。卵白は、加熱ゲル化性、起泡性および乳化性などの加工機能に優れている。食品加工の現場では、液卵白、およびその乾燥品が利用されている。中でも乾熱処理した乾燥卵白は硬く弾力に富んだゲル形成能を有し、同特性は畜肉加工品および中華麺などの食感改善に重用される。しかし、液卵白および乾燥卵白加熱ゲルの物性発現および形成機序に関しては未だ不明な点が存在し、分子レベルで十分な説明が行われていない。そこで、本研究では、分子レベルで卵白タンパク質の加熱ゲル形成機序に関して検討した。LWの加熱(64°C, 10 min)および遠心分離により、未変性のOVAを主成分とするOLdLWを調製した。両者の加熱ゲルの物性測定結果より、OVAは、弾力に富んだゲルを形成するが、OVTおよびLYZが共存することで硬度が増加、弾力が低下することを明らかにした。したがって、固ゆで卵の卵白部の適度な硬さと歯切れの良さを両立した食感はOVA、OVTおよびLYZの相互作用により形成されると推察した。さらに、卵白の加熱ゲル化において、SS結合がゲル形成に寄与することが定説とされてきたが、それに加えて85°C以上の高い温度ではLAN結合も寄与することを明らかにした。同結合はOVTにて最も形成されやすく、ゲル硬度と強い正の相関を示したため、ゲルの硬度増加に寄与することが示唆された。

乾熱処理した乾燥卵白の加熱ゲルは可溶性凝集体を構成単位とした、緻密なゲルネットワークを形成した。その形成には、LAL結合による可溶性凝集体の形成、負電荷の増強、変性温度の低下、およびOVAのN末端側の疎水およびSS結合領域の切断が生じることによる、加熱ゲル化過程における凝集体構造変化の抑制、強い静電反発力、結合領域の切断、およびゲル形成の段階化による分子間結合部位の制限が寄与することが示唆された。その一方で、HDEWではNDEWよりも分子間にSS結合を形成するタンパク質の比率が増加したことより、分子間相互作用の強化が示唆された。以上の結果より、乾熱処理した乾燥卵白水溶液の高硬度ゲル形成能は、乾熱処理によるタンパク質分子の分子間結合部位の制限による可溶性凝集体を構成単位とした緻密なネットワークが形成されることに加えて、分子間SS結合が強化されることに起因することが示唆された。

本研究で得られた知見をもとに、卵白タンパク質の組成調整による多彩なゲル化性の創出、共有結合を効率よく導入する方法の検討、および生産コストの高い乾熱処理の効率化や代替法の検討など社会実装に向けた検討が期待される。

要旨

鶏卵は全世界で年間約 6,500 万トン、日本においても約 260 万トン生産され、家庭での調理のほか、各種の加工食品の原料として広く利用されている。卵白はタンパク質が 9.7~12.0 %を占めその優れた加熱ゲル化性、起泡性および乳化性などの加工機能から畜肉製品、水産練り製品、製菓製パンなどにおいて物性発現を目的として、液状や粉末状の製品が幅広く使用されている。

卵白タンパク質の主成分は 54 %を占めるオボアルブミン (OVA) 、次いでオボトランスフェリン (OVT, 12%) およびリゾチーム (LYZ, 3.4%) で、変性温度はそれぞれ 84、61 および 75°C である。これらのタンパク質の熱変性による凝集により、加熱ゲルのネットワークが形成されるが、これらのタンパク質分子のゲル物性発現への寄与に関しては十分な検討がなされていない。卵白の加熱ゲルは、加熱変性により露出したタンパク質の反応領域を介した分子間疎水結合ならびにジスルフィド (SS) 結合による凝集体形成、およびその重合により形成するとされているが、卵白ゲルを疎水および SS 結合切断剤により処理しても完全に可溶化しないとの報告もある。したがって、SS 結合以外の共有結合が卵白ゲル形成に関与する可能性が推察されるが、十分に検討されていない。

乾燥卵白は液卵白の噴霧乾燥および乾熱処理により製造され、その溶液の加熱ゲルは液卵白に比べて極めて硬く弾力に富んだ物性を示すため、畜肉・すり身加工品および中華麺などの物性制御に重用される。したがって、乾燥卵白と液卵白はゲル形成機序も異なるものと推定され、様々な研究がなされてきたが、その詳細は未だに不明である。

本研究では、各卵白タンパク質の加熱変性および分子間挙動を解析し、ゲル物性発現への寄与、ゲル形成における化学結合の影響を解明すると共に、乾燥卵白ゲルが高硬度化する機序の解明に取り組んだ。

第 1 章 液卵白の加熱ゲル形成機序

ゲルの物性発現に及ぼす OVA およびその他タンパク質の役割

液卵白 (LW) のゲル形成に及ぼす OVA の役割を解明するためには、OVA を精製して LW とゲル化特性を比較する必要があると考えた。適切な精製方法選抜のために、主要な方法にて調製した OVA ゲルの物性を比較した結果、硬度および弾力に差異が認められた。これらの差異は各処理による OVA の変性や試薬の残留によるものと推定され、LW との比較対象として不適切であった。以上より、まず LW より未変性の OVA の分離方法を検討した。加熱し

た卵白を非還元 SDS-PAGE にて分析した結果より、OVT および LYZ はそれぞれ 64°C にて凝集し、OVA は 75°C で凝集することを確認した。この結果を踏まえて、LW の加熱処理 (64°C, 10 min) および遠心分離により凝集物を除去した溶液 (OLdLW) を調製した。還元 SDS-PAGE に供し、OVT および LYZ が除去され、LW と等量の OVA を含有することを確認した。さらに、LW と OLdLW に含まれる OVA は、示差走査熱量分析および表面疎水性の測定値に差異はなかった。以上より、未変性の OVA を分離できたと判断した。

次に LW と OLdLW を加熱処理 (90°C, 30 min) し、ゲルを調製した。厚さ 7.0 mm に切り出し後、Tensipresser MyBoy II にて平板型プランジャーでゲルの全体を高さの 50 % で 2 回連続圧縮し、Bourne (1982) の方法に従い、硬さ、弾力性、および凝集性を比較した。OLdLW ゲルは有意に軟らかく、弾力性および凝集性が高くなった。以上の結果より、OVA は弾力性、凝集性の発現に寄与することが示唆された。一方、OVT および LYZ はゲルの硬さを増強させるが、弾力性および凝集性を低下させることが示唆された。走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察の結果、LW ゲルは構成する粒子のサイズが比較的均質で、空隙の面積が小さく密に配置された像が観察された。一方、OLdLW ゲルは空隙の面積が大きく疎な構造で、LW にはみられない細い繊維状の構造が多数観察された。以上の結果より、OVA は細く繊維状のネットワーク形成に寄与し、OVT および LYZ は OVA の形成する繊維状ネットワークの形成を阻害することが示唆された。

加熱ゲル形成に寄与する共有結合

卵白タンパク質の分子間結合は各タンパク質の加熱変性により誘起され、その程度には加熱温度が大いに影響する。そこで、ゲルの特性と分子間結合との関係について明らかにするために、加熱温度とゲル物性および分子間結合の関係について評価した。LW を採卵後 3 日程度の卵白に相当する pH 9.0、タンパク質濃度 110 mg/mL に調整し、加熱処理 (50°C~100°C, 30 min) した結果、目視にて 60~70°C でゾル形成、75°C 以上ではゲル形成を確認した。Tensipresser MyBoy II を用いて、貫入試験にて測定したゲルの硬度は、加熱温度依存的に増加した。加熱した LW をマルチビーズショッカーにて破碎後、SDS や尿素、ジチオトレイトールを含む Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) にて処理し、ゲルの形成に寄与する結合を比較したところ、80°C 以下では SS 結合の寄与が大きく、85°C 以上では高温ほど SS 以外の共有結合の寄与が大きくなると推定された。そこで、システインまたはセリン残基からデヒドロアラニンを経て形成されるランチオニン (LAN) 結合またはリジノアラニン (LAL) 結合に注目した。凍結乾燥した試料を塩酸加水分解し、LC-Q-TOF にてこれらを定量した結果、卵白の加熱ゲル化時にも LAN および LAL 結合が

形成され、その主体は LAN 結合で、主にシステイン残基より生成することを明らかにした。LAN 結合の生成量は、ゲルの硬度との間に強い正の相関 ($r=0.990, p<0.01$) を示し、100°C 加熱試料にて LAN 結合は卵白中の総システイン残基量の 41.0% 相当生成した。さらに還元 SDS-PAGE の結果、LAN 結合は OVT, LYZ および OVA のいずれにおいても形成され、中でも OVT の分子間にて最も形成されやすいことが明らかとなった。以上の結果より、卵白加熱ゲルの形成には、SS 結合に加えて、LAN 結合も寄与することを明らかとした。同結合は OVT を主体にいずれのタンパク質分子間にも形成され、ゲルの硬度増強に寄与すると推察した。

第 2 章 乾燥卵白のゲル形成機序

乾燥卵白は LW の脱糖処理後、噴霧乾燥に続く乾熱処理により製造される。LW、噴霧乾燥卵白 (NDEW) および乾熱処理乾燥卵白 (HDEW) の水溶液を加熱すると LW と NDEW のゲル硬度は同等である一方、HDEW は極めて硬く弾力に富んだゲルを形成する。従来の研究により、乾熱処理はゲルの硬度向上に寄与し、同処理によりタンパク質の変性および可溶性凝集体の形成が進行するほど、そのゲルは硬く弾力に富むことが明らかとされたが、その機構は分子レベルで十分に解明されていない。そこで、乾熱処理がタンパク質の性状にどのような影響を与え、ゲル化性を改質するのか分子の視点で検討した。

試料には、NDEW および HDEW を使用した。はじめに、SEM にてゲルのネットワークを比較した。ゲルネットワーク構成単位の平均粒子半径は NDEW の $223.6 \pm 18.2 \text{ nm}$ と比較して、HDEW では $18.2 \pm 2.6 \text{ nm}$ と有意に小さかった。0.01% (w/w) 溶液を未加熱または 80°C にて加熱し動的光散乱計にて求めた平均粒子半径は、未加熱における粒子半径は HDEW で $17.8 \pm 1.2 \text{ nm}$ であり、ゲル構成単位と粒子半径は同等であった NDEW では増加したが、HDEW では顕著な変化が認められなかった。以上の結果より、HDEW タンパク質では加熱による分子間の凝集が抑制されることが明らかとなり、その結果 LW のような大きなゲル構成単位の形成を経ずに、可溶性凝集体がそのままゲル構成単位になった緻密で均質なゲルが形成されることが示唆された。

HDEW タンパク質の凝集抑制要因を明らかにすべく、各試料の加熱挙動を解析した。各試料を各温度 (40~90°C) で加熱した結果、NDEW では 60°C を境に急激に濁度が増加し、HDEW 溶液では濁度は徐々に増加することを目視にて確認した。ゲル形成温度は NDEW では 75°C、HDEW ではそれよりも低温の 60°C であった。HDEW を 70°C 以上で加熱した際の硬度は 90°C で加熱した NDEW よりも高かった。Blue-native-PAGE の結果、NDEW では OVT は

60°C、OVA は 75°C でバンド強度が急激に減衰した。一方、HDEW において、OVA および OVT のバンドはより低温から減衰した。以上より、乾熱処理によりタンパク質の変性温度が低温にシフトし、ゲルの形成開始温度が低下したが、昇温による構造変化は緩やかであることが示唆された。次に、各試料の希薄溶液にてタンパク質の三次構造の加熱挙動を解析した。表面疎水性は未加熱において HDEW は NDEW の 5.9 倍高かった。また、表面疎水性の増加開始温度は HDEW が NDEW に比べ低く、その変化は緩やかで変化率も小さかった。タンパク質の表面電荷を表す ζ 電位は未加熱において HDEW は NDEW よりも 13.7 mV 低く、強く負に帯電していることが認められた。NDEW は加熱温度に従い負電荷が増加したが、HDEW では顕著な変動は認められなかった。以上の結果より、HDEW タンパク質は加熱による構造変化の抑制により結合部位に相当する疎水領域の露出が制限されること、何れの温度においても静電反発力が強いことが明らかとなった。

両タンパク質の性状を把握するために、SDS-PAGE のバンドを比較した結果、HDEW タンパク質の可溶性凝集体のバンドは非還元および還元条件の両方で確認されたことから、HDEW の可溶性凝集体の形成には SS 結合以外の共有結合が寄与すると示唆された。さらに、HDEW タンパク質には、OVA および LYZ よりも低分子の領域に NDEW には見られないバンドが観察されたことから、タンパク質の部分切断が推定された。NDEW および HDEW について SS 以外の共有結合を LC-Q-TOF にて分析した結果、HDEW において LAN および LAL 結合が形成されることを明らかとした。乾熱処理においては LAL 結合の形成量は LAN 結合より優勢で、LW のゲル化とは異なる傾向であった。次に、部分切断されたタンパク質を Tricine-SDS-PAGE に供し、OVA よりも低分子側にフラグメント A (40.0 kDa) およびフラグメント B (5.8 kDa) を確認した。これらのフラグメントが何れのタンパク質に由来するか特定するために、Trypsin にて断片化し、LC-Q-TOF にて分析後、Mascot (Matrix Science) にてデータ解析した。その結果より、各フラグメントは OVA に由来し、フラグメント B は N 末端側の約 53~55 残基に相当することが示唆された。OVA は主要な疎水領域を 7 か所、SH 基を 4 つ持つことが報告されており、フラグメント B は疎水領域 2 か所および SH 基を 2 つ含む。したがって、フラグメント B が切り離されたフラグメント A は分子当たりの反応領域数が OVA と比べ減少するため、凝集するタンパク質の数が減少し、巨大なゲル構成単位の形成が抑制されることで、緻密なゲル構造の形成に寄与するものと推察した。

以上の解析より、HDEW タンパク質は乾熱処理にて変性し、LAL 結合による可溶性凝集体の形成、負電荷の増強、変性温度の低下、および OVA の N 末端側の疎水および SS 結合領域の切断が生じ、加熱ゲル化過程において分子構

造の変化抑制に伴う疎水およびSS結合領域の露出制限、強い静電反発力が生じることを明らかにした。これらの作用により、1分子に凝集するタンパク質の数が制限され、構成単位が小さい緻密なゲルネットワークが形成されることが示唆された。

総括

鶏卵は世界中で広く利用される食品のひとつである。卵白は、加熱ゲル化性、起泡性および乳化性などの加工機能に優れている。食品加工の現場では、液卵白、およびその乾燥品が利用されており、畜肉加工品および中華麺などの食感改善に重用される。しかし、卵白加熱ゲルの物性発現および形成機序に関しては未だ不明な点が存在し、分子レベルで十分な解明が行われていない。そこで、本研究では、分子レベルで卵白タンパク質の加熱ゲル形成機序に関して検討した。LWの加熱(64°C, 10 min)および遠心分離により、未変性のOVAを主成分とするOLdLWを精製した。両者の加熱ゲルの物性測定結果より、OVAは、弾力に富んだゲルを形成するが、OVTおよびLYZが共存することで硬度が増加、弾力が低下することを明らかにした。したがって、固ゆで卵の卵白部の適度な硬さと歯切れの良さを両立した食感はOVA、OVTおよびLYZの相互作用により形成されると推察した。卵白の加熱ゲル化において、SS結合がゲル形成に寄与することが定説とされてきたが、それに加えて85°C以上の高い温度ではLAN結合も寄与することを明らかにした。同結合はOVTにて最も形成されやすく、ゲル硬度と強い正の相関を示した。

NDEWと比べて、HDEWの加熱ゲルは、より緻密なゲルネットワークを形成し、硬さや弾力性が増加した。HDEWタンパク質は乾熱処理にて変性し、LAL結合による可溶性凝集体の形成、負電荷の増強、変性温度の低下、およびOVAのN末端側の疎水およびSS結合領域の切断が生じ、加熱ゲル化過程において分子構造の変化抑制に伴う疎水およびSS結合領域の露出制限、および強い静電反発力が生じ、構成単位が小さい緻密なゲルネットワークが形成されることを示唆した。さらに、HDEWにおいて、SS結合にて分子間結合するタンパク質の割合が高く、ゲル形成時に分子間結合も増強されることを明らかにした。

本研究で得られた知見をもとに、卵白タンパク質の組成調整による多彩なゲル化性の創出、共有結合を効率よく導入する方法の検討、および生産コストの高い乾熱処理の効率化や代替法の検討など社会実装に向けた検討が期待される。

4 章 要約

Hen eggs are widely used as food ingredients worldwide because of their gelling, foaming, and emulsifying properties. Heat-induced gelation occurs via hydrophobic and disulfide bond formation among the egg-white proteins. However, few studies have focused on the contribution of covalent bonds other than SS bonds. Ovalbumin, ovotransferrin, and lysozyme are the main components of heat-induced gels, however, their contribution to the gel texture has not been clarified till now. Industrially, heat-treated, dried egg white, which has excellent gelling properties, is commonly used to improve the physical properties of Chinese noodles and meat products. It has been reported that dry-heat treatment greatly affects the gel properties of dried egg whites. Although several mechanisms have been suggested, the mechanisms underlying these properties are poorly understood. In this study, we attempted to elucidate the mechanisms underlying heat-induced gelation of egg-white protein at the molecular level.

First, we investigated the role of ovalbumin, ovotransferrin, and lysozyme, the major proteins involved in the heat-induced gelation of egg whites. Ovotransferrin and lysozyme-deficient egg-white (OLdLW) solutions containing native ovalbumin were prepared from liquid egg whites (LW) subjected to heat treatment at 64 °C and then centrifuged. Texture profile analysis, syneresis rate measurement, and scanning electron microscopy were performed on the heat-induced gels. The OLdLW gel showed more porous and fibrous networks, resulting in decreased hardness, increased resilience, and a water-holding capacity comparable to that of the LW gel. These results suggest that ovalbumin contributes to the water-holding capacity and resilience of egg-white gel, whereas ovotransferrin and lysozyme contribute to increasing gel hardness.

Next, we investigated the intermolecular interactions that contribute to gelation of egg whites. Although the hardness of egg-white gels prepared by heating at 80–100 °C increased with an increase in temperature, their microstructures were almost the same. Turbidity development of the homogenized gel treated with sodium dodecyl sulfate, urea, and dithiothreitol revealed that intermolecular covalent bonds other than SS bonds contributed to egg-white gelation. As a result of analyzing the protein acid hydrolysate, lanthionine bond, a covalent crosslink formed during the gelation process, showed a strong correlation coefficient with gel hardness. The lanthionine bond was formed in every protein species, especially ovotransferrin. These results revealed that lanthionine bond contributed to egg-white gelation and gel hardening.

The gelling properties and protein characteristics of dry-heated egg-white

(HDEW) and non-dry-heated egg-white (NDEW) were investigated to clarify the gel hardening mechanisms of egg-white protein via dry-heat treatment. HDEW formed a hard and elastic gel constructed from a dense network, with a soluble aggregate as a gel structural unit, suggesting that random aggregation was inhibited. Thermal aggregation and gelation of HDEW proteins started at lower temperatures and progressed more gradually than that in NDEW. HDEW forms highly negatively charged soluble aggregates via the lysinoalanine bond, which is a strong crosslink. In addition, approximately 5.8 kDa of the N-terminal peptide of ovalbumin was cleaved because of dry-heat treatment. These results suggest that the HDEW gel network, constructed of small structural units, was formed by intermolecular binding site restriction, which was caused by soluble aggregation with the lysinoalanine bond, reactive site cleavage in ovalbumin, highly negative surface charge, and gradual aggregation. Moreover, the intermolecular SS bonds were fortified in the HDEW gel. These results suggested that the excellent gelling properties of HDEW originated from interaction site suppression, followed by a dense network with structural units of soluble aggregates and fortification of intermolecular SS bonds.

Furthermore, these results indicated that the covalent lanthionine and lysinoalanine bonds play different roles in the development of gel properties, when formed before and during gelation.

謝辞

本研究はキューピー株式会社研究開発本部 (2018~2020 年度)ならびに東京農業大学博士後期課程研究支援制度 (2018~2020 年度)のご支援により遂行できました。この場を借りて深く御礼申し上げます。

本研究の遂行ならびに博士論文の申請にあたりご指導を賜りました、東京農業大学応用生物科学部農芸化学科 高野克己教授、辻井良政教授、応用生物科学部 野口智弘教授、応用生物科学部食品安全健康学科 阿久澤さゆり教授、およびキューピー株式会社研究開発本部ならびに東京農業大学キューピーエッグイノベーション寄付研究部門 半田明弘客員教授に厚く御礼申し上げます。また、実験にご協力いただきました、地域環境科学部 矢口行雄教授および応用生物科学部農芸化学科 大島宏行助教に厚く御礼申し上げます。また、貴重なご助言を頂きました 生命科学部分子微生物学科 内野昌孝教授、応用生物科学部農芸化学科 岡大貴助教、米澤加代助教、および応用生物科学部 小野航助手に厚く御礼申し上げます。

さらに、研究遂行にあたりご支援を賜りましたキューピー株式会社研究開発本部 濱千代善規様、金光智行様、および実験にご協力いただきました市川将弘様、久保愛実様、中本友香様に厚く御礼申し上げます。

そして、実験に御協力いただいた応用生物科学部農芸化学科食料資源理科学研究室 根本裕子さん、松林柊さん、進藤彩貴さん、高島亜美さん、滝沢陸さん、今田久瑠美さん、およびキューピーエッグイノベーション寄付研究部門 小林理々子様をはじめとする皆様に厚く御礼申し上げます。

2021年3月20日

参考文献

- Alleoni, A. C. C. (2006). Albumen protein and functional properties of gelation and foaming. *Scientia Agricola*, 63(3), 291–298. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162006000300013>
- Beveridge, T., Arntfield, S., Ko, S., & Chung, J. K. L. (1980). Firmness of Heat Induced Albumen Coagulum. *Poultry Science*, 59(6), 1229–1236. <https://doi.org/10.3382/ps.0591229>
- Bourne, M.C. (1978) Texture Profile Analysis. *Food Technology*, 32, 62-66.
- Catak, S., Monard, G., Aviyente, V., & Ruiz-López, M. F. (2008). Computational study on nonenzymatic peptide bond cleavage at asparagine and aspartic acid. *Journal of Physical Chemistry A*, 112(37), 8752–8761. <https://doi.org/10.1021/jp8015497>
- Croguennec, T., Nau, F., Pezennec, S., & Brule, G. (2000). Simple rapid procedure for preparation of large quantities of ovalbumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4883–4889. <https://doi.org/10.1021/jf991198d>
- Croguennec T., Guérin-Dubiard C., Nau F. (2007) Riboflavin-Binding Protein (Flavoprotein). In: Huopalahti R., López-Fandiño R., Anton M., Schade R. (eds) Bioactive Egg Compounds. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-37885-3_10
- De Groot, J., & De Jongh, H. H. J. (2003). The presence of heat-stable conformers of ovalbumin affects properties of thermally formed aggregates. *Protein Engineering*, 16(12), 1035–1040. <https://doi.org/10.1093/protein/gzg123>
- Deleu, L. J., Wilderjans, E., Van Haesendonck, I., Courtin, C. M., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2015). Storage induced conversion of ovalbumin into S-ovalbumin in eggs impacts the properties of pound cake and its batter. *Food Hydrocolloids*, 49, 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.03.014>
- Doi, E. (1993) Gels and gelling of globular proteins. *Trends in Food Science and Technology*, 4, 1–5.
- Finley, J. W., Wheeler, E. L., Walker, H. G., & Finlayson, A. J. (1982). Effect of Cystine Oxidation on Lysinoalanine Formation in Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(5), 818–820. <https://doi.org/10.1021/jf00113a004>
- Friedman, M. (1999). Chemistry, biochemistry, nutrition, and microbiology of lysinoalanine, lanthionine, and histidinoalanine in food and other proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1295–1319. <https://doi.org/10.1021/jf981000+>
- Garibaldi, J. A., Donovan, J. W., Davis, J. G., & Cimino, S. L. (1965). Heat Denaturation of the Ovomucin-Lysozyme Properties Electrostatic of Pasteurized Egg White A Source of Damage to the Whipping. *Journal of Food Science*, 33(5), 514–524.
- Geng, F., Xie, Y., Wang, J., Li, S., Jin, Y., & Ma, M. (2019). Large-scale purification of ovalbumin using polyethylene glycol precipitation and isoelectric precipitation. *Poultry Science*, 98(3),

- 1545–1550. <https://doi.org/10.3382/ps/pey402>
- Germes, A. C. (1973). Hydrogen sulphide production in eggs and egg products as a result of heating. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 24(1), 7–16.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.2740240103>
- Gerrard, J. A. (2002). Protein–protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. *Trends in Food Science and Technology*, 13, 391–399.
- Gossett, P.W., Rizvi, S.S.H., & Baker, R.C. (1984). Quantitative analysis of gelation in egg protein systems. *Food Technol.*, 38, 67-96.
- Guha, S., Majumder, K., & Mine, Y. (2018). Egg proteins. *Encyclopedia of Food Chemistry*, (January 2018), 74–84. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21603-X>
- Handa, A., Hayashi, K., Shidara, H., & Kuroda, N. (2001). Correlation of the protein structure and gelling properties in dried egg white products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3957–3964. <https://doi.org/10.1021/jf001460e>
- Handa, A., Takahashi, K., Kuroda, N., & Froning, G. W. (1998). Heat-induced egg white gels as affected by pH. *Journal of Food Science*, 63(3), 403–407. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb15752.x>
- Hasegawa, K., Gotoh, M., Honjo, S., Matoba, T., & Mukai, K. (1987). Determination of the Lysinoalanine Content in Commercial Foods by Gas Chromatography-selected Ion Monitoring. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51(11), 2889–2894. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.51.2889>
- Hasegawa, K., & Iwata, S. (1982). Gas Chromatography-Mass Spectrometry of Lysinoalanine and the Related Crosslinked Amino Acids in Alkali-treated Food Proteins. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46(10), 2513–2520. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.46.2513>
- Hayakawa, S., & Nakai, S. (1985). Relationships of Hydrophobicity and Net Charge to the Solubility of Milk and Soy Proteins. *Journal of Food Science*, 50(2), 486–491. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1985.tb13433.x>
- Hirose, Y., & Kido, S. (2002). Heterogeneity and Allergenicity of the Major Food Allergen, Albumen Ovomuroid: 1. Separation of Three variants of Ovomuroid from Albumen. *Journal of Food Science*, 57, 25–32.
- Iwashita, K., Handa, A., & Shiraki, K. (2017). Co-aggregation of ovalbumin and lysozyme. *Food Hydrocolloids*, 67, 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.01.014>
- Iwashita, K., Handa, A., & Shiraki, K. (2019). Co-aggregation of ovotransferrin and lysozyme. *Food Hydrocolloids*, 89(January 2018), 416–424. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.022>
- Johnson, T. M., & Zabbik, M. E. (1981). Gelation Properties of Albumen Proteins, Singly and in Combination. *Poultry Science*, 60(9), 2071–2083. <https://doi.org/10.3382/ps.0602071>

- Kato, A., Ibrahim, H. R., Kobayashi, K., & Takagi, T. (1990). Excellent Gelation of Egg White Preheated in the Dry State Is due to the Decreasing Degree of Aggregation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(9), 1868–1872. <https://doi.org/10.1021/jf00099a018>
- Kato, A., Ibrahim, H. R., Watanabe, H., Honma, K., & Kobayashi, K. (1989). New approach to improve the gelling and surface functional properties of dried egg white by heating in dry state. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 433–437.
- Kato, A., Ibrahim, H. R., Watanabe, H., Honma, K., & Kobayashi, K. (1990). Structural and Gelling Properties of Dry-Heating Egg White Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(1), 32–37. <https://doi.org/10.1021/jf00091a007>
- Kornguth, E. S., & Waelsch, H. (1963). Protein Modifications catalysed by Transglutaminase. *Nature*, 198, 188–189.
- Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1), 105–132. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0)
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Lubelski, J., Rink, R., Khusainov, R., Moll, G. N., & Kuipers, O. P. (2008). Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(3), 455–476. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7171-2>
- Ma, Y., Zhao, Y., Jiang, Y., & Chi, Y. (2019). Effect of dry heating on the aggregation behaviour and aggregate morphologies of ovalbumin. *Food Chemistry*, 285(July 2018), 296–304. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.170>
- Maga, J. A. (1984). Lysinoalanine in Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32(5), 955–964. <https://doi.org/10.1021/jf00125a001>
- Mann, K. (2007). The chicken egg white proteome. *Proteomics*, 7(19), 3558–3568. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700397>
- Matsudomi, N., Oka, H., & Sonoda, M. (2002). Inhibition against heat coagulation of ovotransferrin by ovalbumin in relation to its molecular structure. *Food Research International*, 35(9), 821–827. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(02\)00085-6](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(02)00085-6)
- Matsudomi, N., Takahashi, H., & Miyata, T. (2001). Some structural properties of ovalbumin heated at 80°C in the dry state. *Food Research International*, 34(2–3), 229–235. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00157-5](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00157-5)
- Matsudomi, N., Takasaki, M., & Kobayashi, K. (1991). Heat-induced aggregation of lysozyme with Ovotransferrin. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55(6), 1651–1653. <https://doi.org/10.1080/00021369.1991.10870828>
- Mine, Y. (1995). Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. *Trends*

- in *Food Science and Technology*, 6(7), 225–232. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)89083-4](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)89083-4)
- Mine, Y. (1996). Effect of pH during the dry heating on the gelling properties of egg white proteins. *Food Research International*, 29(2), 155–161. [https://doi.org/10.1016/0963-9969\(96\)00008-7](https://doi.org/10.1016/0963-9969(96)00008-7)
- Mine, Y. (1997). Effect of Dry Heat and Mild Alkaline Treatment on Functional Properties of Egg White Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 2924–2928. <https://doi.org/10.1021/jf970158b>
- Mizutani, K., Chen, Y., Yamashita, H., Hirose, M., & Aibara, S. (2006). Thermostabilization of ovotransferrin by anions for pasteurization of liquid egg white. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 70(8), 1839–1845. <https://doi.org/10.1271/bbb.60003>
- Nakamura, R., Umemura, O., & Takemoto, H. (1979). Effect of Heating on the Functional Properties of Ovotransferrin. *Journal of Agricultural and Biological Chemistry*, 43(2), 325–330.
- Ogawa, N., Mineki, M., Nakamura, Y., Shimoyamada, M., & Watanabe, K. (2003). Rheological and Microstructural Characteristics of Heat-Induced Gels of Egg White Proteins and Ovalbumin Dry-Heated at 120°C. *Journal of Cookery Science of Japan*, 36(3), 210–218.
- Omana, D. A., Wang, J., & Wu, J. (2010). Ovomucin - a glycoprotein with promising potential. *Trends in Food Science and Technology*, 21(9), 455–463. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.07.001>
- Phillips, L.G., Whitehead, D.M., & Kinsella, J. (1994). Protein gelation. In “Structure-Function Properties of Food Proteins,” ed. by L.G. Phillips, D.M. Whitehead, & J. Kinsella., San Diego: Academic Press, San Diego, pp. 179–204.
- Rombouts, I., Lambrecht, M. A., Carpentier, S. C., & Delcour, J. A. (2016). Identification of lanthionine and lysinoalanine in heat-treated wheat gliadin and bovine serum albumin using tandem mass spectrometry with higher-energy collisional dissociation. *Amino Acids*, 48(4), 959–971. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2139-2>
- Sakamoto, H., Kumazawa, Y. & Motoki, M. (1994). Strength of Protein Gels Prepared with Microbial Transglutaminase as Related to Reaction Conditions. *Journal of Food Science*, 59, 866–871. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb08146.x>
- Schägger H, von Jagow G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.*, 166 (2). 368-79. doi: 10.1016/0003-2697(87)90587-2.
- Schägger H, von Jagow G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem.*, 199 (2), 223-31. doi: 10.1016/0003-2697(91)90094-a.

- Shitamori, S., Kojima, E., & Nakamura, R. (1984). Changes in the heat-induced gelling properties of ovalbumin during its conversion to s-ovalbumin. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48(6), 1539–1544. <https://doi.org/10.1080/00021369.1984.10866350>
- Stephenson, R. C., & Clarke, S. (1989). Succinimide formation from aspartyl and asparaginyl peptides as a model for the spontaneous degradation of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 264(11), 6164–6170. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)83327-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)83327-0)
- Suda, S., Westerbeek, A., O'Connor, P. M., Ross, R. P., Hill, C., & Cotter, P. D. (2010). Effect of bioengineering lactacin 3147 lanthionine bridges on specific activity and resistance to heat and proteases. *Chemistry and Biology*, 17(10), 1151–1160. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.08.011>
- Van Der Plancken, I., Van Loey, A., & Hendrickx, M. E. G. (2005). Changes in sulfhydryl content of egg white proteins due to heat and pressure treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(14), 5726–5733. <https://doi.org/10.1021/jf050289+>
- Yang, S.C.; Baldwin, RE. Functional properties of eggs in foods. In: Stadelman, W.J.; Cotterill, O.J. Egg science and technology. 4 ed. Binghamton: Food Products Press; Haworth Press, 1995. p.405-463.